

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

**SÍNTESE DE NANOESFERAS POLIMÉRICAS MAGNÉTICAS
APLICADAS NA ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO ACETOXI DMU**

Dissertação de Mestrado

JOSLAINE JACUMAZO

GUARAPUAVA - PR

2015

JOSLAINE JACUMAZO

**SÍNTESE DE NANOESFERAS POLIMÉRICAS MAGNÉTICAS
APLICADAS NA ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO ACETOXI DMU**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Carlos Alberto Policiano Almeida

Orientador

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientador

GUARAPUAVA - PR

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

J21s

Jacumazo, Joslaine

Síntese de nanoesferas poliméricas magnéticas aplicadas na encapsulação e liberação controlada do acetoxi DMU / Joslaine Jacumazo. – – Guarapuava, 2015

xvii, 93 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, 2015

Orientador: Carlos Alberto Policiano Almeida

Co-orientador: Najeh Maissar Khalil

Banca examinadora: Dimas Augusto Morozin Zaia, Eryza Guimarães de Castro

Bibliografia

1. Química. 2. Química aplicada. 3. Ferrita de cobalto. 4. Quitosana. 5. Acetoxi DMU. 6. Nanoesferas poliméricas magnéticas. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 542

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Florindo e Bernadete, ao meu irmão Ronaldo e aos meus avós Alzira e Ladislau (in memoriam), por todo apoio, compreensão e amor dedicado principalmente nos momentos difíceis, e a toda família pelo incentivo. Ao meu noivo Israel, por toda compreensão, paciência, dedicação, incentivo e amor. E a Deus por iluminar o meu caminho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos Alberto Policiano Almeida, pela oportunidade, liberdade, incentivo e amizade, e ao meu co-orientador professor Dr. Najeh Maissar Khalil, pela disponibilidade e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do LAPECI e agregados, especialmente Matheus e Cristiano, por toda a amizade e alegria demonstrada e principalmente pela ajuda nas dificuldades.

A Carla Cristina Perez e ao professor Dr. Carlos Roque (UNICAMP), por ceder o Ac. DMU e por toda a atenção durante o tempo em que passei no IQ-UNICAMP para a síntese do fármaco.

Ao professor Dr. Dante Mosca (UFPR), pela sua disponibilidade na realização das medidas de VSM e ZFC-FC.

Ao professor Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia e em especial ao aluno de doutorado Pedro Anizelli (UEL), por toda atenção e disponibilidade na realização das medidas de FTIR e RMN de ^1H .

Ao professor Dr. Ricardo (UNICENTRO-Física) pelas medidas de DSC.

A professora Dra. Eryza Castro (UNICENTRO-Química), pela disponibilidade da realização das medidas de DRX.

Ao professor Dr. Marcos Romano por ceder o laboratório para a produção das nanoesferas.

A UNICENTRO pelo espaço cedido e a CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

***“Ore como se tudo dependesse de Deus,
e trabalhe como se tudo dependesse de você.”***

(Martin Lutero)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	1
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
2.1. Nanopartículas Magnéticas	3
2.1.1. Estabilidade de Nanopartículas Magnéticas	8
2.1.2. Ácido Oleico	9
2.1.3. Ferrita de Cobalto	9
2.1.3.1. Métodos de síntese das NPsM de Ferrita de Cobalto	11
2.2. Biopolímeros	13
2.3. Quitosana	13
2.3.1. Carboximetilquitosana	15
2.3.2. Carboximetilquitosana-bz	16
2.4. Princípio Ativo Acetoxi DMU	17
2.5. Nanopartículas Magnéticas Poliméricas	18
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Reagentes Utilizados	23
4.2. Parte Experimental	23
4.2.1. Síntese das Nanopartículas Magnéticas de Ferrita de Cobalto	24
4.2.2. Síntese do Carboximetilquitosana	26
4.2.3. Síntese do Carboximetilquitosana-bz	26
4.2.4. Síntese do Acetoxi DMU	27

4.2.5.	Síntese das Nanoesferas Poliméricas Magnéticas	29
4.2.6.	Validação do Método Analítico para o Acetoxi DMU por Espectrofotometria UV-Vis	30
4.2.7.	Determinação da Recuperação Percentual do Acetoxi DMU.....	33
4.2.8.	Eficiência de Encapsulação (EE, %)	34
4.3.	Métodos de Caracterização	34
4.3.1.	Difração de Raios X (DRX)	34
4.3.2.	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	35
4.3.3.	Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	35
4.3.4.	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TG/DTA).....	35
4.3.5.	Magnetômetro de Amostra Vibrante (VSM)	35
4.3.6.	ZFC (Zero Field Cooled) e FC (Field Cooled).....	36
4.3.7.	Titulação Condutimétrica	36
4.3.8.	Titulação Potenciométrica	36
4.3.9.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H).....	37
4.3.10.	Potencial Zeta	37
4.3.11.	Espectroscopia UV-Vis	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1.	Nanopartículas Magnéticas de Ferrita de Cobalto	39
5.2.	Princípio Ativo Acetoxi DMU	53
5.3.	Quitosana, Carboximetil quitosana e Carboximetil quitosana-bz.....	54
5.4.	Nanoesferas Poliméricas Magnéticas e Nanoesferas Poliméricas	66
5.5.	Validação do Método Analítico para o Acetoxi DMU	69
5.6.	Recuperação Percentual e Determinação da Eficiência de Encapsulação do Acetoxi DMU	74
6.	CONCLUSÕES.....	77
7.	ESTUDOS COMPLEMENTARES	79

8. REFERÊNCIAS	80
9. APÊNDICES	92
9.1. Apêndice 1	92
9.2. Apêndice 2	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados no trabalho.	23
Tabela 2: Condições experimentais para a síntese da CoFe_2O_4 por coprecipitação.	24
Tabela 3: Variação da quantidade de ácido monocloroacético na síntese do CMQT.	26
Tabela 4: Variação da quantidade de benzaldeído na síntese do CMQT-BZ.	27
Tabela 5: Materiais utilizados para obtenção das nanoesferas poliméricas magnéticas.	30
Tabela 6: Largura a meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade ($35,45^\circ$, 311) das amostras de CoFe_2O_4	40
Tabela 7: Propriedades magnéticas das NPsM de CoFe_2O_4 sintetizadas.	51
Tabela 8: Volumes no ponto de inflexão e grau de carboximetilação das amostras de CMQT.	57
Tabela 9: Volumes do ponto de inflexão e percentagens de GD e GA das amostras de quitosana e CMQT.	59
Tabela 10: Diâmetros das nanoesferas poliméricas magnéticas e nanoesferas poliméricas determinados por DLS.	67
Tabela 11: Valores de potencial zeta das nanoesferas poliméricas magnéticas e nanoesferas poliméricas.	68
Tabela 12: Absorbâncias do Ac.DMU com concentrações variando de 2 a 22 $\mu\text{g/mL}$. .	71
Tabela 13: Resultados obtidos no estudo da exatidão para o Acetoxi DMU.	73
Tabela 14: Níveis de precisão (repetibilidade) para validação do método de determinação do Ac.DMU.	74
Tabela 15: Níveis de precisão (intermediária) para validação do método de determinação do Ac.DMU.	74
Tabela 16: Valores de recuperação percentual e EE % do Ac.DMU.	75

Tabela 17: Atribuição das frequências vibracionais ou bandas em cm^{-1} dos vários tipos de ligações químicas da CoFe_2O_4 sem AO e com AO, obtidas por FTIR. 92

Tabela 18: Atribuição das frequências vibracionais ou bandas em cm^{-1} dos vários tipos de ligações químicas da quitosana e da quitosana modificada, obtidas por FTIR. 93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do comportamento de materiais (a) diamagnéticos e (b) paramagnéticos.	5
Figura 2: Representação dos momentos magnéticos em materiais (a) ferromagnéticos (b) ferrimagnéticos (c) antiferromagnéticos.	5
Figura 3: Esquema da dependência da coercividade em relação ao tamanho das partículas.....	6
Figura 4: Curva de magnetização (M) versus campo magnético (H): (a) materiais superparamagnético e (b) materiais ferro/ferrimagnético. Ms-magnetização de saturação; Mr-magnetização remanente; Hc-coercividade.....	7
Figura 5: Representação da molécula de ácido oleico.....	9
Figura 6: Representação de (a) NPs de CoFe_2O_4 surfactada por AO e (b) detalhamento da ligação metal carboxilato ($-\text{COO}^-$).	9
Figura 7: Representação da estrutura cúbica de espinélio da ferrita de cobalto.....	10
Figura 8: Representação da molécula de quitina, 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose.	14
Figura 9: Estrutura da quitosana (2-amino-2-dexoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose).....	15
Figura 10: Diversas moléculas de derivados obtidos a partir da quitosana.....	15
Figura 11: Representação da estrutura da molécula da carboximetilquitosana.	16
Figura 12: Representação da molécula de CMQT-BZ.	17
Figura 13: Representação da molécula de Ac.DMU, 1,2,3-trimetóxi-5-(4-acetoxiestiril) benzeno.....	18
Figura 14: Representação de sistemas de produção de nanoesferas e nanocápsulas, contendo o fármaco, as NPsM e o polímero de revestimento.	19

Figura 15: Representação de um sistema de administração de fármaco na forma convencional comparado com a forma de liberação controlada.....	20
Figura 16: Esquema representativo do procedimento experimental para a obtenção de NPsM de CoFe_2O_4	25
Figura 17: Reação de formação do sal de diazônio.....	28
Figura 18: Reação de formação do 1,2,3-trimetóxi-5-(4-acetoxiestiril)benzeno, Ac.DMU.....	28
Figura 19: Representação do processo de obtenção das partículas poliméricas magnéticas contendo fármaco.	30
Figura 20: NPsM de CoFe_2O_4 obtida pelo método de coprecipitação, em pó e em meio dispersante.	39
Figura 21: Difrátogramas de DRX dos produtos de síntese por coprecipitação (a) síntese com agitação mecânica de 600 rpm e (b) síntese com agitação mecânica de 1000 rpm.....	42
Figura 22: Histogramas de distribuição dos tamanhos das nanopartículas (a) CoFe_2O_4 (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$	43
Figura 23: Espectros na região do infravermelho (a) CoFe_2O_4 , (b) AO, (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/600}$ (d) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$, (e) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$, (f) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$	45
Figura 24: Amostras dispersas em água e hexano (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$, (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$	46
Figura 25: Termograma da amostra de CoFe_2O_4	48
Figura 26: Termogramas das amostras (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$	48
Figura 27: Curvas de magnetização dos produtos obtidos por coprecipitação, (a) Todas as amostras de CoFe_2O_4 (b) CoFe_2O_4 (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/600}$ (d) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ (e) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ (f) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$	50

Figura 28: Curvas ZFC-FC das NPsM (a) CoFe_2O_4 (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$	52
Figura 29: (a) Sal de diazônio e (b) Ac.DMU.	53
Figura 30: Espectros de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do Ac.DMU.....	54
Figura 31: Reação para obtenção do CMQT.	55
Figura 32: Reação para obtenção do CMQT-BZ.....	56
Figura 33: Condutimetria versus volume de NaOH, (a) CMQT 1,0M, (b) CMQT 1,5M, (c) CMQT 2,5M, (d) CMQT 5,0M.	57
Figura 34: pH versus volume de NaOH e primeira derivada de pH versus volume de NaOH (a) CMQT 1,0M (b) CMQT 1,5M (c) CMQT 2,5M (d) CMQT 5,0M.	58
Figura 35: Espectros de RMN ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$) das amostras de (a) quitosana, (b) CMQT 1,0M, (c) CMQT 1,5M, (d) CMQT 2,5M e (e) CMQT 5,0M.	60
Figura 36: Espectros de RMN ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$) das amostras (a) CMQT-BZ 2,5M, (b) CMQT-BZ 3,5M, (c) CMQT-BZ 4,5M.	61
Figura 37: Espectros na região do infravermelho das amostras de (a) quitosana (b) CMQT 1M (c) CMQT 1,5M (d) CMQT 2,5M (e) CMQT 5M (f) CMQT-BZ 3,5M.	63
Figura 38: Curvas de TG/DTA e DSC das amostras de (a) quitosana (b) CMQT 1,5M e (c) CMQT-BZ 3,5M.....	65
Figura 39: Espectro de comprimento de onda de maior absorção (a) Ac.DMU (b) CMQT 1,5M (c) CMQT-BZ 3,5M.	70
Figura 40: Curvas de calibração padrão do Ac.DMU e gráficos de resíduos para os valores preditos e equações da reta de cada uma das curvas de calibração.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac.DMU: Acetoxi DMU

AO: Ácido oleico

A/O: água/óleo

A/O/A: água/óleo/água

D_c: diâmetro crítico

DLS: Dynamic light scattering

DRX: difração de Raios X

D_{sp}: diâmetro superparamagnético

DTA: análise térmica diferencial

D₂O: água deuterada

EE (%): eficiência de encapsulação em porcentagem

FTIR: espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

GA: grau de acetilação

GC: grau de carboximetilação

GD: grau de desacetilação

H: campo magnético

H_c: coercividade

IPd: índice de polidispersão

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

Me²⁺: metal divalente

Me–O: ligação metal oxigênio

M_r: magnetização remanente

MRI: imagem por ressonância magnética

M_s: magnetização de saturação

N&N: nanociência e nanotecnologia

NPs: nanopartículas

NPsM: nanopartículas magnéticas

O/A: óleo/água

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

T_B: temperatura de bloqueio

T_c: temperatura de Curie

TG: análise termogravimétrica

T_{onset}: temperatura inicial

T_{pico}: temperatura de pico

UV-Vis: região ultravioleta visível

VSM: Magnetômetro de amostra vibrante

RESUMO

Título: Síntese de nanoesferas poliméricas magnéticas aplicadas na encapsulação e liberação controlada de Acetoxi DMU

As nanoesferas poliméricas magnéticas possuem grande potencial de aplicação na área da biomedicina. A obtenção de nanopartículas (NPs) a partir da conjugação de derivados da quitosana com NPsM de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) e com o fármaco Acetoxi DMU podem se tornar sistemas nanoestruturados promissores para a liberação deste fármaco em locais desejados. No presente trabalho, NPsM de CoFe_2O_4 puras e recobertas com ácido oleico (AO) foram sintetizadas pelo método de coprecipitação química, a influência da temperatura e da velocidade de agitação foram analisadas. Os materiais foram caracterizados pelas técnicas de difração de Raios X (DRX), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (PZ), espectroscopia de infravermelho (FTIR), calorimetria diferencial de varredura (DSC), análises termogravimétricas (TG/DTA) e medidas de magnetização (VSM e ZFC-FC). Os resultados confirmaram que a CoFe_2O_4 foi obtida, e que a variação de temperatura influenciou no recobrimento das NPsM pelo AO. As amostras apresentaram magnetização moderada e o tamanho médio das partículas surfactadas analisadas por DLS ficaram abaixo do esperado para a CoFe_2O_4 (21 a 57 nm). O princípio ativo Acetoxi DMU foi sintetizado pela reação de Heck-Matsuda e caracterizado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), comprovando sinais característicos e a pureza da molécula de Acetoxi DMU. Para a utilização da quitosana como polímero de revestimento, foi realizada uma modificação química da sua superfície pela inserção de grupos carboximetil e grupos benzil originando um polímero anfifílico. Os derivados obtidos, carboximetilquitosana e carboximetilquitosana-bz, foram caracterizados pelas técnicas de titulação condutimétrica e potenciométrica, espectroscopia de infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análises termogravimétricas (TG/DTA). De acordo com os resultados obtidos, os grupos carboximetil foram inseridos na molécula formando o carboximetilquitosana (parte hidrofílica), com grau de carboximetilação (GC) entre 22,1% e 44,1%. Também foi comprovada a inserção dos grupos benzil formando o carboximetilquitosana-bz (parte hidrofóbica), com grau de substituição (GS) entre 40% e 66%. Na parte final do trabalho foi realizada a validação do método analítico para o Acetoxi DMU e sintetizada as nanoesferas poliméricas e nanoesferas poliméricas magnéticas através do método de emulsão difusão do solvente. Os materiais obtidos foram caracterizados por espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (PZ). Conforme o resultado conclui-se que as NPs de CoFe_2O_4 encontram-se no interior das nanoesferas. As nanoesferas poliméricas magnéticas apresentaram tamanhos entre 332 e 482 nm superior às nanoesferas poliméricas, que apresentaram tamanhos entre 134 e 320 nm. Para calcular a eficiência de encapsulação (EE%) do fármaco foi utilizada a técnica de espectrofotometria no UV-Vis. O resultado obtido situou-se entre 16,0% a 96,1 %, mostrando que a melhor encapsulação ocorreu com o polímero carboximetilquitosana na presença da CoFe_2O_4 . Essas nanoestruturas obtidas podem ser aplicadas no direcionamento do fármaco Acetoxi DMU a alvos específicos, seja para o combate ou para o controle de doenças oncológicas.

Palavras-chaves: Ferrita de cobalto. Quitosana. Acetoxi DMU. Nanoesferas poliméricas magnéticas.

ABSTRACT

Title: Synthesis of magnetic polymer nanospheres applied to the encapsulation and controlled release of Acetoxy DMU

The magnetic polymer nanospheres have great application potential in the biomedicine field. Obtain nanoparticles (NPs) starting from the chitosan derivative combination with cobalt ferrite (CoFe_2O_4) MNPs and with Acetoxy DMU drug can become nanostructured systems promising for release of this drug in desired sites. In this work, the CoFe_2O_4 pure NPs and oleic acid (OA) coated, were synthesized by the chemical coprecipitation method, influence of temperature and of the stirring rate have been analyzed. The material was characterized by X-ray diffraction techniques (XRD), dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ZP), infrared spectroscopy (FTIR), Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TG / DTA), and magnetization measurements (VSM and ZFC-FC). The results confirmed the obtained CoFe_2O_4 , and that temperature variation influence the coating of the MNPs by AO. The samples presented moderate magnetization and the average size of the coated particles analyzed by DLS were lower than expected for CoFe_2O_4 (21 a 57 nm). The active principle Acetoxy DMU was synthesized Heck-Matsuda reaction and characterized in proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), which proved the characteristic groups and purity of the obtained Acetoxy DMU molecule. To use the chitosan as a coating polymer, was carried out chemical modification surface by insertion of carboxymethyl groups and benzyl group giving a amphiphilic polymer. The obtained derivatives, carboxymethylchitosan and carboxymethylchitosan-bz, was characterized by conductimetric and potentiometric titration techniques, infrared spectroscopy (FTIR), proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TG / DTA). Accordance with the obtained results, the carboxymethyl groups was insertion in the molecule, the carboxymethylchitosan formed (hydrophilic parts), with of carboxymethylation degree (GC) 22,1% and 44,1%. Was also insertion confirmed of the benzyl groups forming the carboxymethylchitosan-bz (hydrophobic parts), with substitution degree (GS) between 40% to 66%. At the end of work was conducted validation of the analytical method for the Acetoxy DMU and synthesized polymer nanosphere and magnetic polymer nanosphere by the emulsion diffusion of the solvent method. The obtained material characterized by dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ZP). According to obtained results, it can be conclude that the CoFe_2O_4 NPs were inserted the nanospheres inside. The magnetic polymeric nanospheres showed average size between 332 e 482 nm higher to polymeric nanospheres, which showed average size between 134 and 320 nm. Order to calculate the drug encapsulation efficiency (EE %) was used in the spectrophotometric technique UV-Vis. The obtained results stood at between 16.0% and 96.1%, by showing that the best encapsulation has occurred with the carboxymethylchitosan polymer in the presence of the CoFe_2O_4 . These obtained nanostructures it can apply in drug targeting to specific targets Acetoxy DMU, be for combat or control of oncological diseases.

Keywords: Cobalt ferrite. Chitosan. Acetoxy DMU. Magnetic polymer nanospheres.

1. INTRODUÇÃO

O avanço da ciência em nossa sociedade, entre os mais relevantes fatores, depende do desenvolvimento de novos materiais, do entendimento de suas propriedades para determinar a sua aplicação e da integração de diferentes áreas (THASSU *et al*, 2007). É nesse contexto que a Nanociência e Nanotecnologia (N&N), termos utilizados na literatura moderna, apresentam-se como potencial favorável no desenvolvimento de novas nanoestruturas, que podem ser utilizadas em diferentes ramos, tais como biologia, medicina, farmácia e engenharias (BUSHAN *et al*, 2007; THASSU *et al*, 2007). A Nanociência pode ser definida como a compreensão das propriedades e do comportamento de um material e o controle do mesmo em escala nanométrica (0,1 a 100 nm, este limite é referente a escala atômica e molecular) (BUSHAN *et al*, 2007; THASSU *et al*, 2007), enquanto que a Nanotecnologia possui o objetivo de aplicações práticas aproveitando essas propriedades diferentes apresentadas por esses nanomateriais (BUSHAN *et al*, 2007).

Os nanocompostos apresentam propriedades físico-químicas intrínsecas, por exemplo: elevada área superficial, diâmetro reduzido, possibilidade de modificações estruturais e associações de agentes ativos por adição de ligantes na superfície. Esses sistemas resultantes são extremamente dependentes do tamanho das partículas que os compõem. Podem ser definidos como nanomateriais quando possuem pelo menos uma dimensão na faixa de tamanho nanométrica, abaixo do diâmetro crítico, capaz de modificar alguma de suas propriedades. Portanto, existirá um nanomaterial se ele apresentar propriedades que se mostrem exclusivamente devido ao tamanho reduzido e diferentes do material bulk. Sendo assim, não basta o material apresentar dimensões de razão nanométrica para ser considerado um nanomaterial e sim se mostrar com propriedades diferentes do material a nível molecular (ZARBIN, 2007; MAINARDES *et al*, 2009).

Entre as aplicações práticas em sistemas químicos, físicos e biológicos (BUSHAN *et al*, 2007), destaca-se a utilização dos nanomateriais na prevenção de poluição industrial, em cosméticos, na informática e, especialmente, na liberação direcionada de fármacos através de nanopartículas (NPs) poliméricas (THASSU *et al*, 2007) por meio da corrente sanguínea.

Os sistemas de distribuição de medicamentos através de NPs, pela corrente sanguínea apresentam extrema importância e proporcionam o direcionamento e controle

a alvos específicos para a liberação do fármaco, minimizando os efeitos colaterais, tais como a destruição de tecido saudáveis (THASSU *et al*, 2007).

Entre as nanopartículas magnéticas (NPsM) utilizadas nesses sistemas podem ser citadas a magnetita (KARIMI *et al*, 2013), as ferritas de cobalto (KARIMI *et al*, 2013), níquel (KARIMI *et al*, 2013), entre outras. Essas NPsM são inseridas no interior ou ligam-se à superfície das NPs poliméricas e ao aplicar um campo magnético (H) externo ocorre o direcionamento das nanoestruturas ao tecido tumoral e a liberação do fármaco (SCHERER *et al*, 2002). A ferrita de cobalto pode ser utilizada para esse fim, possui a fórmula CoFe_2O_4 , apresenta moderada magnetização de saturação e considerável estabilidade química, sua oxidação ocorre de forma lenta (HOUSHIAR *et al*, 2014). Entretanto, para que as NPsM possam ser utilizadas em sistemas de liberação de fármacos, é necessário o seu revestimento com um polímero compatível (UNSOY *et al*, 2014), minimizando sua possível oxidação.

Os polímeros que podem ser empregados para o revestimento e obtenção de NPs poliméricas podem ser sintéticos, por exemplo: ácido poli (lático) (PLA), ácido poli (glicólico) e o ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), e os polímeros naturais como a albumina e a quitosana (NAHAR *et al*, 2008).

A quitosana é um biopolímero com considerável capacidade de adsorção, é atóxica e biocompatível com os tecidos vivos. É biodegradável e possui propriedades antifúngicas, antibacterianas e antitumorais, além do mais apresenta grupos funcionais reativos (NH_2 e OH) ao longo da matriz polimérica (DASH *et al*, 2011), possibilitando a modificação de sua superfície para torná-la mais adequada de acordo com a sua utilização (UNSOY *et al*, 2014). Entre os derivados da quitosana que podem ser sintetizados cita-se o carboximetilquitosana (CMQT) e o carboximetilquitosana-bz (CMQT-BZ). Para a obtenção do CMQT, a hidroxila da quitosana reage com um grupo carboximetil (JIN *et al*, 2012) formando uma molécula com caráter hidrofílico. E para a formação do CMQT-BZ, o grupo amino da molécula de CMQT reage com um aldeído através de uma aminação redutiva (RABEA *et al*, 2005), sendo atribuído ao CMQT-BZ o caráter hidrofóbico. O polímero anfifílico agora pode ser utilizado para revestir o fármaco e as NPsM (THASSU *et al*, 2007).

Neste âmbito, vários fármacos vêm sendo utilizados para combater inúmeros formas de câncer por métodos tradicionais (NCI, 2015), e também por sistemas de liberação direcionada e controlada através de NPs poliméricas (BAE *et al*, 2011). Entre esses medicamentos encontra-se o resveratrol (1,3-hidróxi-5-(4-hidroxiestiril) benzeno),

pertencente à classe de polifenóis e ocorre naturalmente em uma vasta quantidade de plantas, especialmente a uva. O resveratrol é extremamente saudável ao ser humano por possuir atividades cardioprotetora, antioxidantes, anti-inflamatórias e principalmente prevenir várias formas de câncer (MATOS *et al*, 2014). Nestas circunstâncias, destacam-se também os derivados sintéticos do resveratrol, tais como o Acetoxi DMU (Ac.DMU) e o DMU-212. Alguns estudos relatam que essas moléculas possuem atividades iguais ou superiores ao resveratrol (MORO *et al*, 2008). Por se tratar de compostos com elevado valor aquisitivo é necessário que se evite a perda, bem como as desvantagens farmacológicas causadas pelos tratamentos convencionais. Para isso pode-se utilizar da Nanotecnologia produzindo NPs poliméricas contendo essas moléculas.

A conjugação de NPsM com o fármaco Ac.DMU e os derivados da quitosana, podem formar um material nanoestruturado e proporcionar um avanço científico imensurável, pois através do campo externo as partículas podem ser conduzidas até o tumor maligno e o fármaco pode ser liberado, evitando danos às células saudáveis e perdas de medicamento por uso de doses menores (PARVEEN *et al*, 2012). Essa combinação para aplicações endovenosas pode apresentar-se como uma opção a sistemas convencionais.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1. Nanopartículas Magnéticas

Diversos tipos de NPs apresentam grande importância no meio científico e vem sendo amplamente estudadas. As NPsM destacam-se porque apresentam a particularidade da propriedade magnética, sendo possível a sua manipulação por meio de um campo magnético (FARAJI *et al*, 2010). Apresentam, também, elevados potenciais de aplicação em fluidos magnéticos, armazenamento de dados, células solares, sensores, gravações magnéticas, catálise, eletrônicos e, especialmente, na medicina (ZI *et al*, 2009; LOPEZ *et al*, 2012), área em grande ascensão atualmente, pois possibilita alternativas para o tratamento localizado de vários tipos de tumores malignos (LOPEZ *et al*, 2012; UNSOY *et al*, 2014), através da liberação direcionada de fármacos e hipertermia (BALDI *et al*, 2007). Na medicina, também são utilizadas como agentes de contrastes em imagem por ressonância magnética (MRI) (BALDI *et al*, 2007; LOPEZ *et al*, 2012).

Para o uso em sistemas de vetorização de fármacos, as NPsM podem ser constituídas por átomos distintos ou íons, geralmente obtidos de óxido de ferro conhecidos como ferritas, sendo compostas por O_2 , Fe^{3+} e um metal bivalente Me^{2+} ($Me = Fe, Mn, Co, Zn, Ni$) (KARIMI *et al*, 2013). Seu tamanho deve estar entre 10 e 100 nm, pois partículas menores que 10 nm podem ser facilmente filtradas pelo sistema renal e removidas do corpo (THOMAS *et al*, 2013) e partículas maiores que 100 nm o sistema imunológico consegue reconhecê-las ocasionando a possível remoção da corrente sanguínea (KIEVIT *et al*, 2011).

É importante entender as propriedades magnéticas que as NPsM apresentam. As respostas magnéticas de materiais, ao campo magnético aplicado, é a grandeza denominada susceptibilidade magnética ($\chi_m = \frac{M}{H}$, M é magnetização do material e H o campo aplicado). Essa é uma característica intrínseca de cada material, levando-os a ser classificados como diamagnéticos ou paramagnéticos, ferrimagnéticos, ferromagnéticos e antiferromagnéticos (FARIA e LIMA, 1995; CULLITY e GRAHAM, 2009).

Os materiais constituídos por átomos diamagnéticos (Figura 1a) não apresentam magnetização na ausência de um campo magnético, enquanto na presença, ocorre a indução dos momentos (baixa magnitude) na orientação contrária ao campo aplicado (FARIA e LIMA, 1995).

Em materiais paramagnéticos, ferrimagnéticos, ferromagnéticos e antiferromagnéticos um cancelamento parcial dos momentos magnéticos dos elétrons ocorre e o átomo fica com um momento magnético resultante (FARIA e LIMA, 1995; PANKHURST *et al*, 2003; CALLISTER, 2010).

Os materiais paramagnéticos (Figura 1b) não apresentam magnetização resultante (magnetização resultante (M) é igual a zero) na ausência de um campo externo, e na presença, os dipolos se alinham no sentido do campo (CULLITY e GRAHAM, 2009).

Os materiais ferromagnéticos (Figura 2a) possuem dipolos magnéticos permanentes na ausência de um campo magnético, ou seja, exibem uma alta magnetização espontânea devido ao acoplamento dos momentos magnéticos de átomos vizinhos que se alinham uns aos outros. Esse alinhamento é devido à existência de um campo magnético interno, também chamado de campo molecular. A interação eletrônica entre dois átomos vizinhos é denominada acoplamento de troca (FARIA e LIMA, 1995; MATHEW e JUANG, 2007).

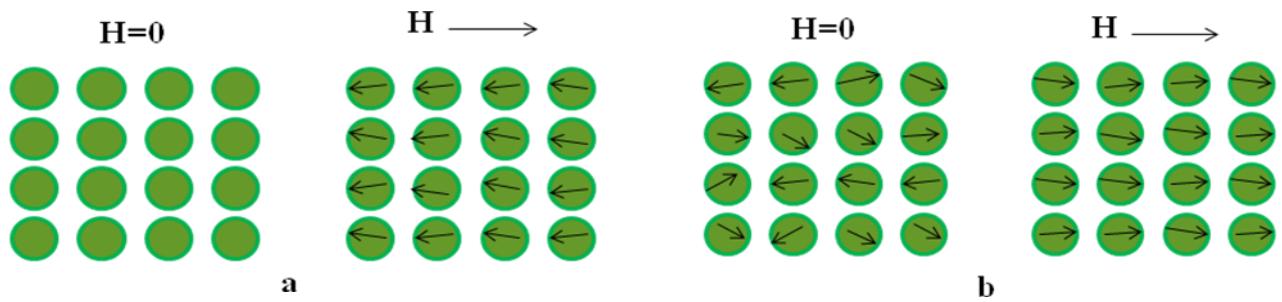


Figura 1: Representação do comportamento de materiais (a) diamagnéticos e (b) paramagnéticos. Fonte: CALLISTER (2010)

Os materiais ferrimagnéticos (Figura 2b) e antiferromagnéticos (Figura 2c) são também conhecidos por possuírem o acoplamento de troca, o qual proporciona o alinhamento espontâneo dos momentos magnéticos atômicos, porém de forma antiparalela. Materiais ferrimagnéticos que possuem dois ou mais íons distintos apresentam momentos magnéticos diferentes. O cancelamento dos momentos magnéticos é diferente de zero, ou seja, não é completo, porém é menor que de materiais ferromagnéticos. Nos materiais antiferromagnéticos os momentos magnéticos são quase totalmente cancelados devido ao alinhamento antiparalelo, como consequência, a magnetização torna-se praticamente nula (FARIA e LIMA, 1995; MATHEW e JUANG, 2007; CULLITY e GRAHAM, 2009; CALLISTER, 2010).

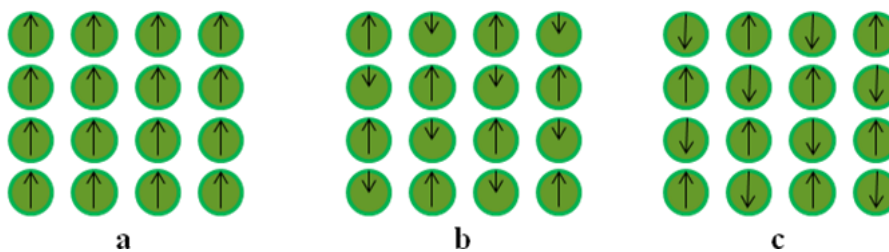


Figura 2: Representação dos momentos magnéticos em materiais (a) ferromagnéticos (b) ferrimagnéticos (c) antiferromagnéticos. Fonte: CALLISTER (2010)

A Figura 3 apresenta um gráfico da relação da coercividade (H_c) com a dependência do tamanho da partícula para os domínios magnéticos do estado de monodomínios superparamagnéticos para o estado de multidomínios ferromagnéticos.

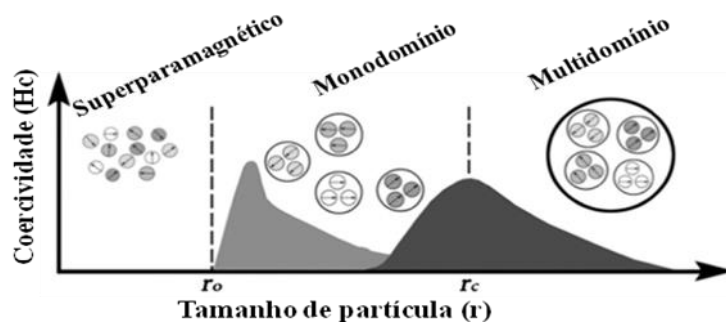


Figura 3: Esquema da dependência da coercividade em relação ao tamanho das partículas. Fonte: KARIMI et al (2013)

Os materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, com tamanho elevado de partículas (acima do diâmetro crítico (D_C), apresentam inúmeros domínios magnéticos para minimizar a energia magnetostática. Conforme o tamanho vai diminuindo, as paredes que limitam esses domínios têm suas estruturas e espessuras modificadas. No entanto, quando esses materiais atingem o D_C da partícula, propriedade essa característica de cada material (ferrita de cobalto por volta de 70 nm, magnetita em torno de 25 nm), vão sendo formados multidomínios devido ao aumento da energia na formação das paredes de domínio, o que não é bom para o processo de formação de nanopartículas. Segundo a literatura, os monodomínios são configurações mais convenientes para nanopartículas magnéticas e eles encontram-se abaixo do D_C (MATHEW e JUANG, 2007; FARAJI *et al*, 2010; KARIMI *et al*, 2013).

Portanto, a H_c , uma das propriedades magnéticas do material, possui relação direta com o tamanho das NPsM, ao diminuir o diâmetro das NPsM diminui a H_c , onde os materiais em estado ferri/ferromagnético passa a apresentar comportamento superparamagnético (ZI *et al*, 2009) e a ser considerados materiais em escala nanométrica.

O superparamagnetismo é o comportamento magnético de partículas pequenas (abaixos do D_C) constituídas por um único domínio magnético (MATHEW e JUANG, 2007), e a magnetização das NPsM é classificada como um grande e único momento magnético, ou seja, a junção de todos os momentos magnéticos próprios carregados pelos átomos. Esse comportamento é resultado da grande tendência de alinhamento dos momentos magnéticos das partículas com o campo aplicado, e ocorre quando a (H_c) é nula, não ocorrendo a perda de energia no processo de reversibilidade da direção da

magnetização do material imposta pela inversão do campo magnético aplicado (JEONG *et al*, 2007).

O comportamento superparamagnético contribui para a estabilidade coloidal das NPsM em meio fisiológico, evitando aglomerações por processo magnético, que pode causar embolia capilar. Esses materiais também apresentam rápida e excelente resposta ao campo aplicado (JEONG *et al*, 2007).

O comportamento superparamagnético (Figura 4a) de NPsM pode ser observado a partir da curva de variação da magnetização (emu/g) versus variação do campo magnético aplicado (H), onde há ausência de histerese, ou seja, o material analisado não apresenta magnetização na ausência de um campo magnético. Em NPsM ferromagnéticas (Figura 4b) uma curva de histerese é observada no mesmo gráfico (SINNECKER, 2000; SUN, 2006).

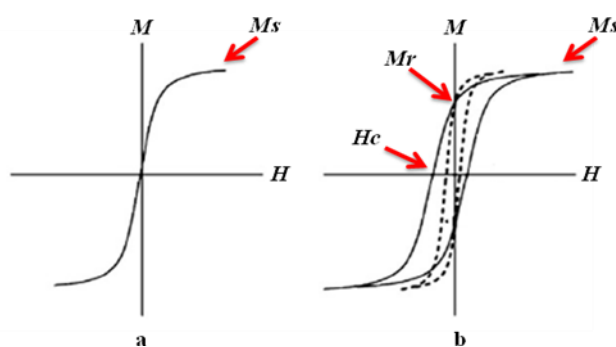


Figura 4: Curva de magnetização (M) versus campo magnético (H): (a) materiais superparamagnético e (b) materiais ferro/ferrimagnético. Ms-magnetização de saturação; Mr-magnetização remanente; Hc-coercividade. Fonte: SUN (2006)

Analisando a curva de magnetização versus o campo aplicado para NPs superparamagnéticas (Figura 4a) e ferro/ferrimagnéticas (Figura 4b), inicialmente o momento magnético resultante de cada partícula está orientado em direções distintas e a magnetização é nula, o campo é aplicado e o momento magnético da partícula começa a se orientar no sentido do campo até atingir a magnetização de saturação (M_s) nesse momento ocorre o alinhamento dos dipolos magnéticos na mesma direção do campo aplicado, alinhamento máximo. Neste momento o campo magnético aplicado é reduzido e os momentos magnéticos das partículas se desalinham, consequentemente sua magnetização diminui, o campo chega a zero, as partículas ferromagnéticas apresentam uma considerável magnetização remanente (M_r) e as partículas superparamagnéticas

apresentam M_r desprezível, ou seja, as NPs ferromagnéticas mesmo na ausência de um campo magnético apresentam magnetização e as NPs superparamagnéticas na ausência de um campo não retêm magnetização. Para que ocorra a desmagnetização completa o campo aplicado é invertido e seu módulo varia até o valor em que a magnetização é igual a zero, valor conhecido como H_c . No caso de partículas superparamagnéticas, quando o campo magnético é removido, os momentos se desalinham e não apresentam valores de H_c , partículas com esse tipo de comportamento são recomendadas para aplicações em medicina. Entretanto, partículas ferro/ferrimagnéticas apresentam valores de H_c , muitas vezes valores elevados. Ao aumentar o campo na direção negativa os dipolos vão se orientando até atingir uma nova M_s agora no sentido oposto, ao reverter o campo aplicado ocorre uma nova orientação dos domínios, ocorrendo a repetição do ciclo de histerese. A área interna da curva de histerese significa a quantidade de energia que foi dissipada no processo da obtenção do ciclo de histerese (HARRIS, 2002).

2.1.1. Estabilidade de Nanopartículas Magnéticas

As NPsM possuem uma elevada razão área superfície-volume, por conseguinte, apresentam tamanhos reduzidos e uma elevada energia livre de superfície. Para minimizar essa energia as partículas tendem a aglomerar-se durante a rota sintética, com a consequente diminuição da área superficial. As NPsM ainda contam com fatores adicionais para a agregação, o valor de pH e a atração magnética entre as partículas. Esses fatos apresentam influências significativas no tamanho das partículas, bem como na sua forma, aglomeração e/ou agregação e, principalmente, na sua estabilidade, quando dispersa em um meio fluido. Outro fator que influencia a estabilidade das NPsM é a oxidação devido à alta reatividade da sua superfície química, quando em contato com oxigênio. Isso ocasiona a perda abrupta de magnetização e dispersabilidade (KUCHIBHATLA *et al*, 2000).

Para que esses problemas sejam solucionados existem estratégias de estabilização, ou seja, o uso de um agente estabilizador adsorvido à superfície das NPsM. Várias substâncias podem ser utilizadas como agentes estabilizantes, e as mais importantes são os surfactantes, tais como ácido oleico, ácido esteárico e ácido láurico (KUCHIBHATLA *et al*, 2000; ZHANG *et al*, 2006).

2.1.2. Ácido Oleico

O ácido oleico (AO) (Figura 5) é uma molécula orgânica da classe dos ácidos carboxílicos, que possui uma cadeia longa de 18 carbonos e uma instauração em sua estrutura, sendo chamado de ácido graxo insaturado (YU *et al*, 2015).

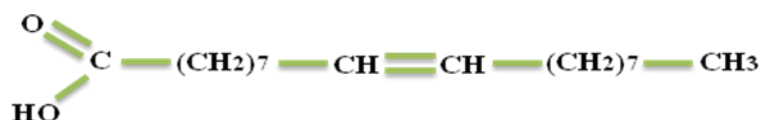


Figura 5: Representação da molécula de ácido oleico. Fonte: LU *et al* (2008)

O AO é conceituado como um excelente tensoativo orgânico, pois possui uma boa interação com os metais através do grupo -COOH , fato este observado na Figura 6 que representa uma NPs de CoFe_2O_4 (LU *et al*, 2008; ROONASI e HOLMGREN, 2009).

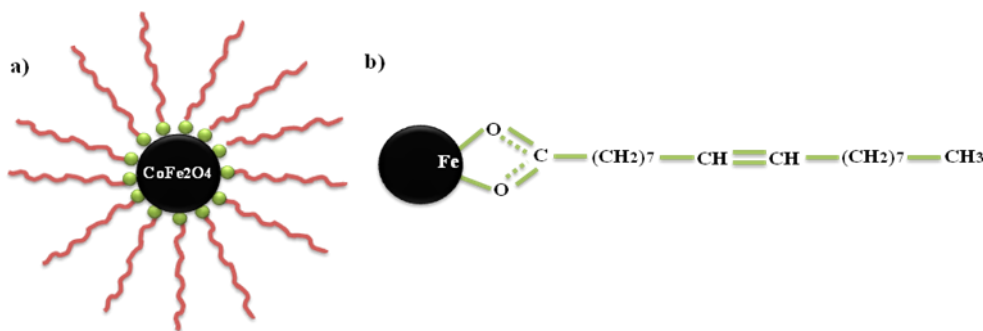


Figura 6: Representação de (a) NPs de CoFe_2O_4 surfactada por AO e (b) detalhamento da ligação metal carboxilato (-COO^-). Fonte: LU *et al* (2008) e YANG *et al* (2010)

O AO é uma molécula de proteção bastante utilizada no revestimento de NPsM para evitar sua oxidação, bem como atribuir a elas novas propriedades, por exemplo, torná-las hidrofóbicas e assim evitar as aglomerações (LU *et al*, 2008; ROONASI e HOLMGREN, 2009).

2.1.3. Ferrita de Cobalto

De uma forma geral, as ferritas são compostas, basicamente, por óxido de ferro, Fe_2O_3 , e um metal bivalente, que no caso da ferrita de cobalto é o Co^{2+} . A maioria das

ferritas apresentam estrutura do tipo espinélio com um empacotamento cúbico de faces centradas de átomos de oxigênio, sendo que os íons metálicos (cátions) ocupam os interstícios entre os átomos de oxigênio (ânions), formando os sítios tetraédricos e os sítios octaédricos (CULLITY e GRAHAM, 2009; HOUSHIAR *et al*, 2014), como pode ser observado na Figura 7, que apresenta a CoFe_2O_4 com estrutura cúbica de espinélio.

Os espinélios das ferritas podem ser classificados como normais, sendo os sítios tetraédricos compostos por íons bivalentes, Me^{2+} , e os sítios octaédricos por íons trivalentes, Fe^{3+} , $((\text{Me}^{2+})_{\text{tetraédrico}} [\text{Fe}^{3+}]_{\text{octaédrico}} \text{O}_4)$. O espinélio invertido pode ser descrito como os íons trivalentes, Fe^{3+} , ocupando o sítio tetraédrico e metade do sítio octaédrico e os íons divalentes, Me^{2+} , ocupando a outra metade do sítio octaédrico, $((\text{Fe}^{3+})_{\text{tetraédrico}} [\text{Me}^{2+}\text{Fe}^{3+}]_{\text{octaédrico}} \text{O}_4)$.

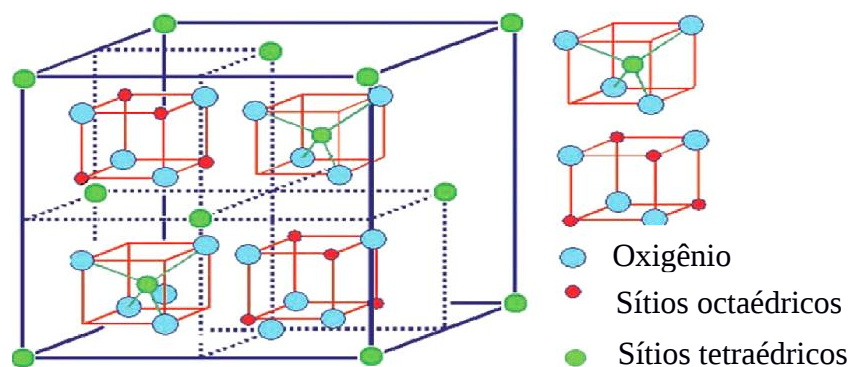


Figura 7: Representação da estrutura cúbica de espinélio da ferrita de cobalto. Fonte: HOUSHIAR *et al* (2014)

Na estrutura com o espinélio parcialmente inverso, tanto os sítios tetraédricos quanto os sítios octaédricos são ocupados por íons Me^{2+} e Fe^{3+} , $((\text{Me}^{2+}\text{Fe}^{3+})_{\text{tetraédrico}} [\text{Me}^{2+}\text{Fe}^{3+}]_{\text{octaédrico}} \text{O}_4)$. A ocupação de sítios tetraédricos ou octaédricos dependem, em muitos casos, do método de preparação do material (SZOTEK *et al*, 2006; KUMAR *et al*, 2013; HOUSHIAR *et al*, 2014), bem como da alta eletronegatividade do oxigênio, que faz ligações iônicas fortes com os íons trivalentes e bivalentes, e vai depender da distribuição iônica dos íons. Essas características vão determinar as posteriores aplicações do material.

Geralmente, as NPsM de CoFe_2O_4 apresentam estrutura cúbica de espinélio inverso $((\text{Fe}^{3+})_{\text{tetraédrico}} [\text{Co}^{2+}\text{Fe}^{3+}]_{\text{octaédrico}} \text{O}_4)$, mas a estrutura cúbica de espinélio parcialmente inverso $((\text{Co}^{2+}\text{Fe}^{3+})_{\text{tetraédrico}} [\text{Co}^{2+}\text{Fe}^{3+}]_{\text{octaédrico}} \text{O}_4)$ também é encontrada na

literatura (ZHANG *et al*, 2010; KUMAR *et al*, 2013). A CoFe_2O_4 possui propriedades magnéticas e é considerada material de elevada dureza por apresentar elevada coercividade (H_c), e manifestar magnetização remanente (M_r). Também exibe um moderado valor de magnetização de saturação (M_s) e uma considerável estabilidade química (ZHAO *et al*, 2007; XIAOA *et al*, 2010; AMIRI e SHOKROLLAHI, 2013). Porém, algumas pesquisas revelam que essas propriedades podem apresentar valores de H_c , M_s e M_r baixos, retificando que as propriedades magnéticas dependem essencialmente do método de preparação das partículas. Normalmente a CoFe_2O_4 apresenta propriedades denominadas ferri/ferromagnéticas, fortemente influenciadas pelo método de síntese (TORCHILIN, 2006; JUN *et al*, 2008). A literatura reporta que à temperatura de 0 K a M_s da CoFe_2O_4 é máxima e vai diminuindo conforme ocorre o aumento da temperatura. Ela cai para zero na temperatura de Curie (T_c) em 793 K, e passa a apresentar um comportamento paramagnético acima da T_c (FRANCO e SILVA, 2010).

Segundo estudos científicos a CoFe_2O_4 possui D_c de monodomínio de 70 nm e D_{sp} próximo a 10 nm (TORCHILIN, 2006; JUN *et al*, 2008; KARIMI *et al*, 2013), a temperatura ambiente. Chinnasamy *et al* (2003) descreveram valores de D_c de 40 nm para a ferrita de cobalto, enquanto Xiao *et al* (2010) e Gupta e Kompella (2006) afirmaram que NPsM com tamanhos menores que 20 nm não retêm magnetização, mas não respondem bem a um campo magnético, sendo o tamanho crítico de 10 nm para o material passar a apresentar propriedades superparamagnéticas. Contudo, partículas ferri/ferromagnéticas e superparamagnéticas são utilizadas no transporte de fármacos. NPs com comportamento superparamagnético são as mais indicadas, pois não retêm magnetização na ausência de um campo magnético externo, evitando aglomerações (TORCHILIN, 2006).

2.1.3.1. Métodos de síntese das NPsM de Ferrita de Cobalto

As partículas de CoFe_2O_4 podem ser obtidas por diversas rotas sintéticas, entre eles destacam-se as mais utilizadas, a microemulsão, a coprecipitação e o sol-gel.

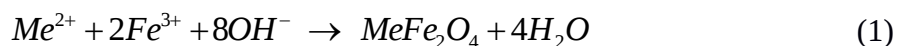
A síntese por microemulsão consiste em um sistema com duas fases líquidas imiscíveis, água (A) e óleo (O). Basicamente são três tipos descritos na literatura, O/A, A/O e bicontínuo. O sistema O/A pode ser formado a partir da baixa concentração da fase oleosa e na presença de emulsificantes com equilíbrio hidrófilo-lipofílico; já o

sistema A/O pode ser formado a partir da baixa concentração da fase aquosa e com a presença de emulsificantes; o sistema bicontínuo pode ser formado quando a concentração da fase oleosa e da fase aquosa é similar. Os surfactantes são responsáveis pela estabilidade do sistema. Partículas obtidas por microemulsão resultam em tamanhos uniformes (WANG *et al*, 2006; FARAJI *et al*, 2010).

O método sol-gel é um dos métodos mais empregados na obtenção de materiais particulados. O sol consiste na dispersão de partículas coloidais em um fluido, e o gel é constituído pela estrutura rígida de partículas coloidais ou de cadeias poliméricas. Basicamente ocorre à transição do sistema sol para o sistema gel que imobiliza a fase líquida nos interstícios. A fase dispersa e fase dispersante estão divididas de forma homogênea no sistema. No processo de obtenção das NPsM são utilizadas soluções aquosas de sais inorgânicos ou alcóxidos metálicos solubilizados em solventes orgânicos (RAJAEIYAN e BAGHERI-MOHAGHEGHI, 2013).

Coprecipitação é um dos métodos sintéticos que apresenta diversas vantagens em relação aos outros por apresentar homogeneidade química, de fácil e simples execução a temperaturas não tão altas, e equipamentos de síntese acessíveis e de baixo custo. O tempo de reação é relativamente rápido, com boa reatividade do material obtido, porém possui uma desvantagem de não ser possível controlar o tamanho das partículas. O processo de obtenção é simples e baseia-se na mistura de sais inorgânicos em meio aquoso, seguido da precipitação com uma base. O precipitado é lavado e seco em estufa (FARAJI *et al*, 2010; SINKO *et al*, 2012; RAJAEIYAN e BAGHERI-MOHAGHEGHI, 2013).

Normalmente, as ferritas são preparadas segundo a reação química representada na Equação 1,



O Me representa o metal bivalente presente nas ferritas, tais como Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} . Essa reação de coprecipitação possui relação estequiométrica de 2:1, Fe^{3+}/Co^{2+} , e o pH de precipitação pode situar-se entre 8 e 14, dependendo da concentração da base utilizada na síntese (FARAJI *et al*, 2010). Devido à simplicidade e eficácia desse método ele foi escolhido para obtenção das NPsM.

2.2. Biopolímeros

Os biopolímeros ou polímeros naturais vêm sendo considerados alternativas aos materiais provenientes dos derivados do petróleo (ABDI, 2015). Geralmente são biocompatíveis e biodegradáveis, produzidos por organismos vivos e presentes na maioria deles tais como: celulose, amido, proteínas, quitosana e outros. Suas funções principais são catálise de reações, armazenamento de carbono, armazenamento de fósforo e mecanismo de defesa e proteção em relação a ataques de outras células (SINGH, 2011). Esses biopolímeros despertam grande interesse por vantagens adicionais, como a possibilidade de modificações em sua estrutura, propiciando a obtenção de moléculas derivadas para o uso específico (KURITA 2006).

Os polissacarídeos são considerados polímeros naturais, de elevada massa molar. Destacam-se nesse cenário a quitina (quitosana) e a celulose, consideradas polissacarídeos estruturais com funções biológicas, agindo como elementos de sustentação (KOZARSKI *et al*, 2014).

2.3. Quitosana

A quitosana (2-amino-2-dexoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose) é um copolímero linear obtido da desacetilação da quitina (2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose) (DASH *et al*, 2011).

A quitina, pode ser observada na Figura 8 e a quitosana na Figura 9. Elas possuem estruturas semelhantes, no entanto, a quitina possui o grupo acetamido (-NHCOCH_3) no carbono na posição dois (C-2) e a quitosana possui o grupo amino (-NH_2). A quitina, por sua vez, é o segundo polímero mais abundante do planeta, superada somente pela celulose (DASH *et al*, 2011). Ela foi isolada, primeiramente, no ano de 1811 por Braconnot em fungos *Agaricus volvaceus*. Entretanto, somente em 1894 Hoope-Seyler descreveu a quitosana. Ele realizou experimentos com a quitina, na presença de hidróxido de potássio concentrado sob refluxo a 180 °C, e obteve um produto solúvel em ácidos orgânicos e ácido clorídrico, mais tarde denominado quitosana. Porém, os estudos e aplicações da quitina e quitosana só se intensificaram a partir de 1970, sendo a quitina produzida em grande escala industrial no Japão. Hoje em dia, esses polissacarídeos são bastante promissores e utilizados em diversas pesquisas de bioaplicações (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

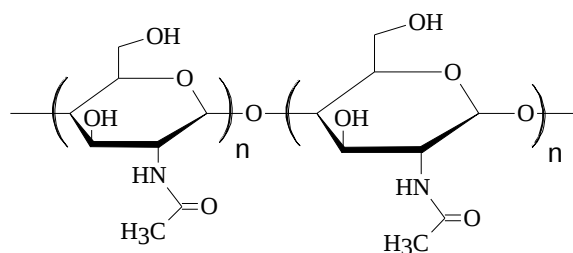


Figura 8: Representação da molécula de quitina, 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose.
Fonte: RINAUDO et al (2006)

A quitina é obtida de fontes naturais, principalmente de exoesqueletos de crustáceos, insetos e fungos. Possui uma solubilidade extremamente limitada, solúvel em hexafluoracetona e hexafluoro-2-propanol, porém a solubilidade está associada ao tipo de quitina obtido (RINAUDO *et al*, 2006; PILLAI *et al*, 2009). Para resolver esse problema pode ser realizada uma reação de desacetilação através do tratamento térmico da quitina com hidróxido de sódio, originando o seu derivado, a quitosana (DASH *et al*, 2011). A quitosana não possui solubilidade em água, solventes orgânicos e bases. É solúvel em alguns ácidos orgânicos, e em pH baixo (~ 3), quando o grupo NH_2 fica protonado, atribuindo a molécula caráter hidrofílico (RINAUDO *et al*, 2006; PILLAI *et al*, 2009).

Quando a molécula de quitina apresenta grau de desacetilação superior a 60% é considerada quitosana. O grau de desacetilação é a quantidade de grupamentos amino livres na estrutura molecular da quitosana, e o grau de acetilação é quantidade de grupamento acetamido livres na estrutura molecular da quitina. No processo de desacetilação ocorre a substituição do grupo acetamido presentes na quitina por grupos amino primários, com a consequente obtenção da quitosana (KUMIRSKA *et al*, 2011).

Na Figura 9 é possível observar a estrutura da quitosana. Ela possui os grupos acetamido, amino, e hidroxilas em sua matriz polimérica. A quitosana é denominada polímero policatiônico, onde as unidades de repetição estão ligadas pelas ligações beta-glicosídicas carbonos na posição um (C-1) e carbonos na posição quatro (C-4) (DASH *et al*, 2011). Os grupos reativos amino e hidroxilas possibilitam a modificação ou alteração da estrutura molecular.

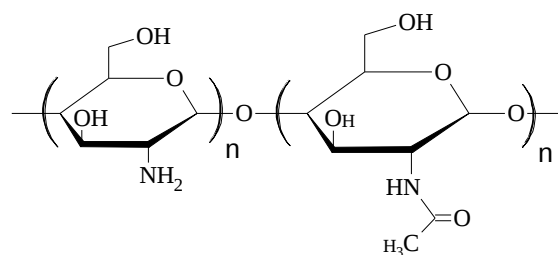


Figura 9: Estrutura da quitosana (2-amino-2-dexoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose). Fonte: DASHE et al (2011)

A quitosana possibilita a aplicação em diversas áreas, como biotecnologia, alimentação, agricultura, medicina, farmacológica, cosméticos (GONSALVES *et al*, 2011). Para tornar possível a utilização da quitosana em diversas aplicações, e especialmente na área farmacológica, em estruturas nanoparticuladas de liberação de fármacos, é preciso melhorar as suas propriedades estruturais com a inserção de novos grupos funcionais, conferindo ao polímero propriedades que atendam às aplicações finais (molécula anfifílica) (CASETTARI *et al*, 2012). Diversos são os derivados que podem ser obtidos da quitosana como pode ser observado na Figura 10.

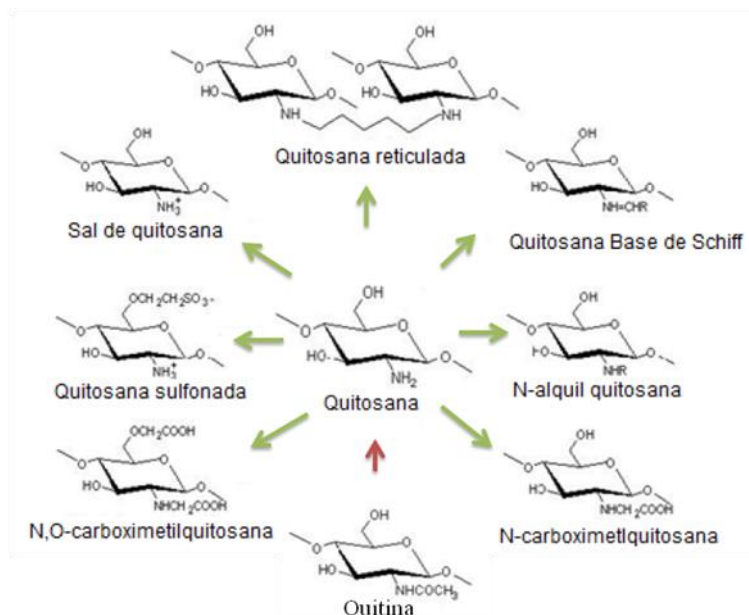


Figura 10: Diversas moléculas de derivados obtidos a partir da quitosana. Fonte: GONSALVES et al (2011)

2.3.1. Carboximetilquitosana

Uma das alternativas para melhorar a solubilidade da quitosana em meio fisiológico e em diferentes pHs, bem como melhorar sua aplicabilidade, é realizar uma modificação em sua molécula. Isso pode ser conseguido com a síntese da carboximetilquitosana (CMQT) (ABREU *et al*, 2009; BIDGOLI *et al*, 2010; GONSALVES *et al*, 2011), ou seja, a reação da quitosana com grupos carboximetil (carboximetilação com ácido monoclóricoacético), os quais reagem com as hidroxilas ou com o grupo amino da molécula, dependendo das condições do sistema. Essa reação deve ser realizada em meio fortemente alcalino para que ocorra a ativação da hidroxila e, conseqüentemente, o ataque nucleofílico no cloro do ácido monoclóricoacético (ABREU *et al*, 2009).

Para que a carboximetilação ocorra somente na hidroxila é necessário realizar a síntese em baixas temperaturas, com isso o grupamento amino fica livre para posteriores reações. A molécula da CMQT pode ser observada na Figura 11.

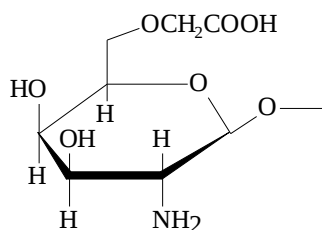


Figura 11: Representação da estrutura da molécula da carboximetilquitosana. Fonte: UPADHYAYA *et al* (2013)

Esse derivado mantém as propriedades da quitosana, tais como alta viscosidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, solubilidade em amplo intervalo de pHs, e também a capacidade de formar géis e interações com diversas substâncias (UPADHYAYA *et al*, 2013). Portanto, a obtenção desse derivado torna-se interessante para aplicabilidade em futuros estudos.

2.3.2. Carboximetilquitosana-bz

Os polímeros anfifílicos apresentam em sua estrutura uma parte hidrofílica, e substituintes hidrofóbicos introduzidos. Portanto, podem ser utilizados na liberação de fármacos hidrofóbico, maximizando a solubilização do fármaco e deixando a parte hidrofílica em contato com o meio fisiológico (DEBRASSI *et al*, 2011).

Para a obtenção do polímero anfifílico, é utilizada a quitosana como polímero de partida, que reage com um grupo carboximetil, e produz a CMQT (reação de carboximetilação). Após essa etapa, para a formação da parte hidrofóbica da molécula de CMQT, o grupo NH_2 da matriz polimérica reage com a carbonila de um aldeído, formando uma base de Schiff (KUMAR *et al*, 2004). Nesse processo é bastante utilizado o benzaldeído para inserção do anel aromático no monômero de CMQT. Na Figura 12 pode ser observado a molécula obtida, carboximetilquitosana-bz (CMQT-BZ).

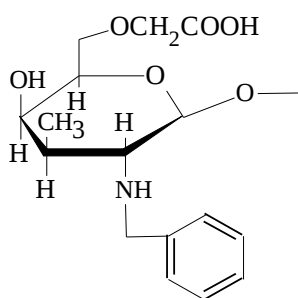


Figura 12: Representação da molécula de CMQT-BZ. Fonte: MOHAMEDA *et al* (2013)

A CMQT-BZ, molécula derivada da quitosana tem sido utilizada em diversas aplicações, como exemplo, para aumentar a solubilidade e diminuir a toxicidade de fármacos hidrofóbicos, imobilização enzimática, em fungicidas e na área médica (RABEA *et al*, 2005; MOHAMEDA *et al*, 2013).

2.4. Princípio Ativo Acetoxi DMU

O Acetoxi DMU (1,2,3-trimetóxi-5-(4-acetoxiestiril) benzeno) observado na Figura 13, é um análogo sintético do resveratrol, dos estilbenos e do DMU-212. O resveratrol é uma fitoalexina pertencente a uma classe de compostos designados antibióticos naturais. Sua presença ocorre em mais de setenta espécies distintas de plantas, encontrado especialmente na uva, como resposta ao estresse causado por ataques de fungos ou outras pragas. Ele é um polifenol abundante no vinho tinto (BAUR *et al*, 2006; MORO *et al*, 2008; ALONSO *et al*, 2009; PASTOR *et al*, 2013).

O composto resveratrol já tinha sido citado em 1985 por Kimura *et al*, que concluíram se tratar de uma substância importante na precaução de inflamações. Também foi comprovado que ele possui propriedades que atrasam o envelhecimento e suprimem os radicais livres (JANG *et al*, 1999), age contra doenças oncológicas (vários

tipos de câncer) (WANG *et al*, 2008; KARTHIKEYAN *et al*, 2013), por exemplo, câncer no colo retal (EMÍLIA *et al*, 2012), antiviral (OH *et al*, 2012), inibição da agregação plaquetária e vasodilatação (WANG *et al*, 2015). O DMU-212 demonstrou que é eficiente no combate ao câncer de ovário (PIOTROWSKA *et al*, 2014).

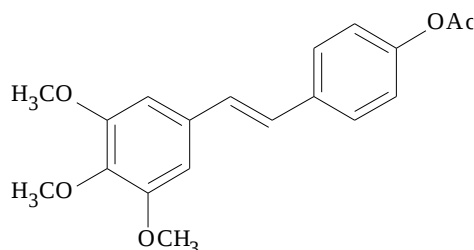


Figura 13: Representação da molécula de Ac.DMU, 1,2,3-trimetóxi-5-(4-acetoxiestiril) benzeno.

O Acetoxi DMU (Ac.DMU) é um composto inédito por conta de sua ação anticancerígena. Ele possui fórmula estrutural similar ao resveratrol, massa molar em torno de 328 g/mol, e é uma molécula lipofílica, de coloração amarelo-claro. Por se tratar de uma substância nova existem poucas informações na literatura. Apenas um estudo foi realizado na Unicamp, setor de biologia (CAMARGO *et al*, 2011), em que 25 mg/kg do composto Acetoxi DMU foi aplicado em ratos portadores do carcinosarcoma de Walker 256, por 5 dias da semana, durante 50 dias, ou até a morte dos ratos. O resultado encontrado do tratamento fez diminuir em 50% o tamanho de tumores e aumentou em 70% a sobrevivência dos ratos tratados (CAMARGO *et al*, 2011).

Estudos da molécula de DMU-212, o revelam como um agente anticancerígeno com atividade quimioprotetora igual ou superior ao resveratrol (SALE *et al*, 2004; SALE *et al*, 2005). É importante destacar o Ac.DMU, pois sua síntese é mais simples que a do resveratrol, além de apresentar maior rendimento.

2.5. Nanopartículas Magnéticas Poliméricas

Nos últimos anos, uma série de sistemas particulados estão sendo extensivamente investigados. Entre esses sistemas podem ser destacados os dendrímeros, lipossomos, ciclodextrinas, e NPs poliméricas, utilizados no transporte de pequenas moléculas bioativas para a posterior liberação, favorecendo sua eficácia e diminuindo a toxicidade (NAAHIDI *et al*, 2013).

Em sistemas de NPs poliméricas podem ser inseridas NPsM que auxiliam o exato direcionamento ao sítio-alvo através de um campo magnético externo. Esse sistema pode ser chamado de NPsM poliméricas. As NPsM poliméricas contendo o princípio ativo são injetadas no ser humano via intravenosa ou arterial e um campo magnético externo é utilizado para direcioná-las e concentrá-las no alvo desejado para que o princípio ativo seja liberado nas células doentes (HUANGA *et al*, 2012).

O tamanho das NPs poliméricas deve situar-se entre 10 e 1000 nm, podendo ser produzidas como nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 14). Para liberação controlada de fármacos o tamanho ideal deve estar entre 100 e 300 nm para evitar que ocorra a obstrução das veias da corrente sanguínea. As nanoesferas são caracterizadas por possuírem uma matriz polimérica sólida e homogênea onde o princípio ativo e as NPsM ficam uniformemente ou fisicamente dispersas no polímero. Nas nanocápsulas, há a presença de um núcleo oleoso envolvido por uma membrana polimérica, onde o princípio ativo e as NPsM ficam no núcleo oleoso (KUMARI *et al*, 2010; NAAHIDI *et al*, 2013).

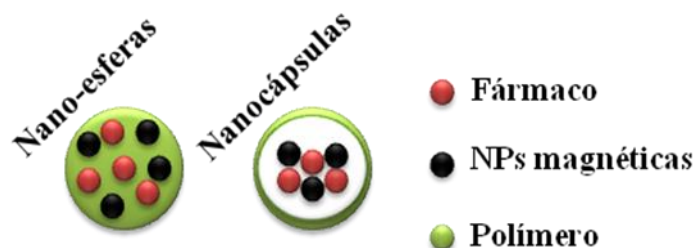


Figura 14: Representação de sistemas de produção de nanoesferas e nanocápsulas, contendo o fármaco, as NPsM e o polímero de revestimento. Fonte: KUMARI *et al* (2010).

As NPsM poliméricas possuem o princípio ativo adsorvido em sua superfície ou disperso em seu interior. Esta molécula pode ser hidrofóbica, hidrofílica, proteínas, peptídeos, vacinas, entre outros. NPsM poliméricas apresentam grande estabilidade em fluidos biológicos, além de possuírem baixo custo de armazenamento e atenuarem os efeitos colaterais (KUMARI *et al*, 2010). Entretanto, as NPsM poliméricas podem liberar o fármaco de diferentes formas, tais como: difusão por meio da matriz polimérica das nanoesferas, dessorção (o fármaco situa-se na superfície das NPs), erosão da matriz polimérica, difusão por meio da parede das nanocápsulas, ou uma combinação entre erosão e difusão. Dessa forma, o tipo de polímero utilizado na

produção das NPs vai determinar o mecanismo de liberação do composto ativo. O tipo de polímero também interfere nas características finais das NPs, como morfologia, diâmetro da NPs, eficiência da encapsulação e carga superficial (FREDENBERGA *et al*, 2011; WEISER e SALTZMAN, 2014).

Existem vários métodos de síntese para a produção das NPs poliméricas que podem ser adaptados a produção das NPs poliméricas, exemplos, salting-out, emulsão deslocamento do solvente, emulsão difusão do solvente e emulsão evaporação do solvente (REIS *et al*, 2006; RAOA *et al*, 2011). O que determina o método a ser utilizado é a natureza do fármaco, para fármacos lipofílicos podem ser utilizados os métodos de emulsão deslocamento do solvente, emulsão difusão e salting-out, para fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos pode ser utilizado o método de emulsão evaporação do solvente, no caso hidrofílico usa-se a técnica dupla emulsão água-óleo-água (A/O/A), e no caso de fármacos hidrofóbicos usa-se a técnica simples emulsão óleo-água (O/A) (THOTE *et al*, 2005; WISCHKE e SCHWENDEMAN, 2008).

A liberação de fármacos por nanoestruturas proporciona uma alternativa a tratamentos de longo prazo, apresentando vantagens em relação a administração convencional de medicamentos, tais como, redução dos efeitos adversos, redução no número de doses aplicadas, capacidade de atravessar barreiras fisiológicas, proteção do fármaco contra degradação, e manter o efeito terapêutico desejado (VENDRUSCOLO *et al*, 2005; CHAVANPATIL *et al*, 2006). A Figura 15 aponta a comparação da administração de fármacos em tratamentos convencionais com a liberação controlada de NPs poliméricas.

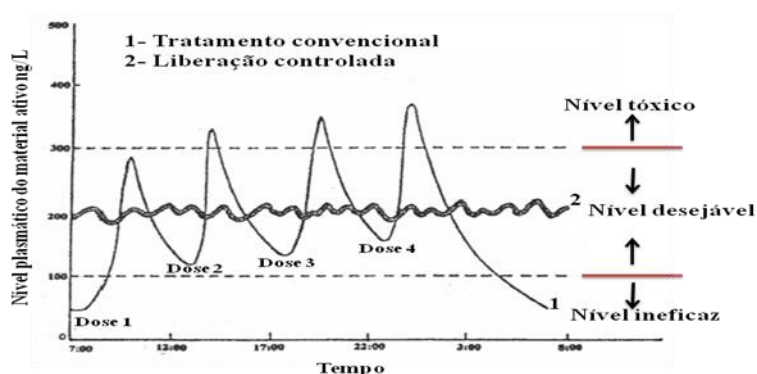


Figura 15: Representação de um sistema de administração de fármaco na forma convencional comparado com a forma de liberação controlada. Fonte: DASH e CUDWORTH II (1998)

O tratamento convencional requer a aplicação de várias doses ao dia para conservar as concentrações plasmáticas terapeuticamente eficazes, sendo que o nível do fármaco pode cair abaixo da concentração mínima eficaz (tratamento ineficiente) ou ultrapassar a concentração mínima tóxica (ocasionando danos ao paciente). Enquanto que a liberação controlada mantém a ação do fármaco em um nível desejado no plasma por um longo período sem ir a níveis tóxicos ou cair a níveis ineficazes (DASH e CUDWORTH II, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Síntese e caracterização de nanoesferas poliméricas magnéticas, pelo método de emulsão difusão do solvente, contendo o princípio ativo Acetoxi DMU, encapsulado na matriz polimérica de derivados da quitosana.

3.2. Objetivos Específicos

- i. Sintetizar e caracterizar as nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (NPsM de CoFe_2O_4) por coprecipitação;
- ii. Sintetizar e caracterizar o princípio ativo, Acetoxi DMU pela reação de Heck-Matsuda;
- iii. Sintetizar e caracterizar o carboximetilquitosana e o carboximetilquitosana-bz, partindo da molécula de quitosana;
- iv. Incorporar o Acetoxi DMU as nanopartículas poliméricas magnéticas, através da metodologia de emulsão difusão do solvente;

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes Utilizados

Na Tabela 1 são apresentados os reagentes utilizados durante as sínteses ao longo desse trabalho.

Tabela 1: Reagentes utilizados no trabalho.

Reagente	Fórmula	Procedência	Pureza
Hdróxido de sódio	NaOH	Anidrol	97,0%
Cloreto de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	Vetec	98,0%
Cloreto de ferro anidro	FeCl ₃	LAFAN	98,0%
Ácido nítrico	HNO ₃	Synth	65,0%
Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Synth	-
Acetona	C ₃ H ₆ O	Synth	99,5%
Álcool iso-propílico	C ₃ H ₇ OH	Vetec	99,5%
Quitosana	(C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _n	Sigma Aldrich	GD 74-85%
Ácido monocloroacético	ClCH ₂ CO ₂ H	Sigma Aldrich	99,0%
Álcool etílico	C ₂ H ₅ OH	Synth	99,5%
Boroidreto de sódio	NaBH ₄	Sigma Aldrich	98,0%
Metanol	CH ₃ OH	Panreac	99,9%
Éter	(C ₂ H ₅) ₂ O	Merck	99,9%
Nitrato de sódio	NaNO ₃	Synth	PA
Anilina	C ₆ H ₇ N	Merck	PA
Acetato de sódio	C ₂ H ₃ NaO ₂	Vetec	PA
Acetato de paládio	C ₄ H ₆ O ₄ Pd	Sigma Aldrich	-
Tetrahidrofurano	C ₄ H ₈ O	Sigma Aldrich	-
Álcool metílico	CH ₃ OH	Panreac	99,9%
Acetato de etila	C ₄ H ₈ O ₂	Synth	PA
Tween 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	Sigma Aldrich	-

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Síntese das Nanopartículas Magnéticas de Ferrita de Cobalto

As NPs de CoFe_2O_4 foram sintetizadas por coprecipitação, na presença e na ausência de AO, nas condições estabelecidas na Tabela 2. Em um béquer contendo 1600 mL de água ultrapura, foi adicionado 128,0 g de NaOH ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) e aquecido a 100°C , sob agitação mecânica constante, originando a **solução 1**. Paralelamente foram preparadas duas soluções, uma de 133,0 mL de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (15,9 g), e outra de 266,0 mL de FeCl_3 Anidro (21,60 g). Essas duas soluções foram misturadas e sobre elas adicionado 64,00 mL de HNO_3 , originando a **solução 2**. Ambas as soluções foram aquecidas anteriormente à mistura, ou seja, a solução de hidróxido de sódio a 100°C e a solução contendo os metais a 80 ou 90°C . A **solução 2** foi vertida rapidamente sobre a **solução 1**, sob agitação mecânica vigorosa por 1 hora, formando um precipitado negro. Logo após, a essa mistura foi adicionado 10,00 mL de AO, gota a gota, a 80 ou 90°C , permanecendo a reação sob agitação mecânica vigorosa, por mais 1 hora. Esta etapa não foi realizada para a CoFe_2O_4 sem o AO. Posteriormente, o sistema foi deixado resfriar até temperatura ambiente. Com o auxílio de imãs ocorreu a decantação das NPs, e o pH de coprecipitação foi 13. A solução teve, então, o pH ajustado entre 4 e 5 com ácido nítrico. Em seguida foi realizada a lavagem das NPs com uma mistura de acetona e água ultrapura (5 vezes) para retirar possíveis íons que não reagiram, também o excesso de AO, impurezas diversas, e deixar o pH final do material em 7. As NPs foram secas em estufa por 12 horas a 60°C (GYERGYEKA *et al*, 2012). O esquema experimental pode ser observado na Figura 16.

Tabela 2: Condições experimentais para a síntese da CoFe_2O_4 por coprecipitação.

Experimentos NPsM Temperatura X agitação mecânica	Temperatura da base ($^\circ\text{C}$)	Temperatura dos metais ($^\circ\text{C}$)	Agitação mecânica (rpm)
Ferrita de cobalto sem AO (CoFe_2O_4)	100	85	800
Ferrita de cobalto com AO ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-(80/600)$)	100	80	600
Ferrita de cobalto com AO ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-(90/600)$)	100	90	600
Ferrita de cobalto com AO ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-(80/1000)$)	100	80	1000
Ferrita de cobalto com AO ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-(90/1000)$)	100	90	1000

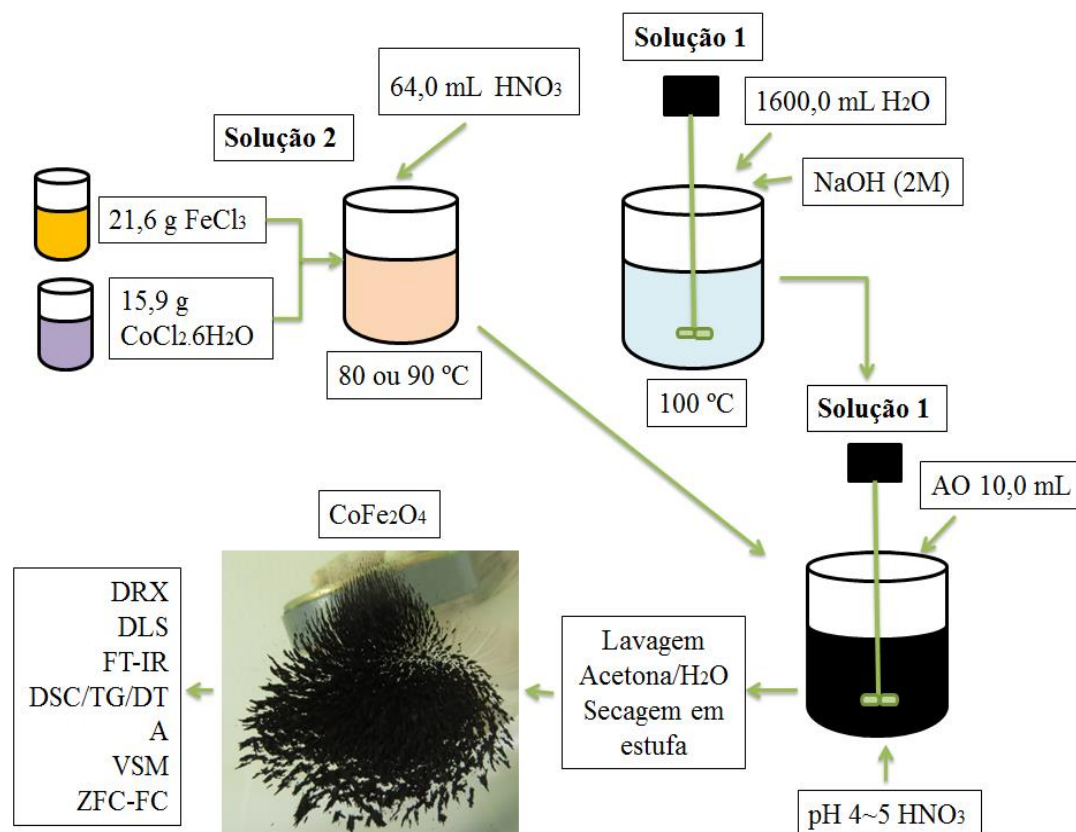


Figura 16: Esquema representativo do procedimento experimental para a obtenção de NPsM de CoFe_2O_4 .

As NPsM de CoFe_2O_4 foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, devido à simplicidade de execução desse método. O AO foi inserido na rota sintética a fim de diminuir a energia de superfície das NPs para minimizar a aglomeração, pois funciona como um surfactante, atenuando a atração entre as NPsM. Além disso, foi usado com o intuito de melhorar as propriedades das partículas (FARAJI *et al*, 2010; GYERGYEKA *et al*, 2012) conferindo a elas caráter hidrofóbico (YANG *et al*, 2010) e estabilidade (FARAJI *et al*, 2010) para posteriores aplicações.

A base utilizada na rota sintética foi o hidróxido de sódio, por ser uma base forte, com maior potencial de precipitação. As temperaturas utilizadas foram relativamente baixas, quando comparado com outros métodos de síntese, entre 80 e 100 °C para que ocorresse a magnetização, e o ácido nítrico foi utilizado na solução contendo o cobalto e ferro, para uma melhor solubilização dos sais. A solução dos metais foi vertida rapidamente sobre a base para facilitar o processo de nucleação das partículas, e a agitação mecânica foi mantida constante e vigorosa para a obtenção de tamanhos homogêneos. O pH de precipitação das amostras foi 13 e, após as lavagens

(água/acetona 50:50), para retirada de possíveis resíduos orgânicos e inorgânicos, passou para 7

4.2.2. Síntese do Carboximetilquitosana

Em um balão de 500,0 mL, foram adicionados 10,10 g de NaOH e uma mistura de 10,00 mL de água ultrapura com 90,00 mL de álcool iso-propílico. A essa solução, foi adicionado 4,000 g de quitosana e mantida sob agitação magnética constante por 1 hora a $\pm 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, para promover a alcalinidade e intumescimento da quitosana. Logo após, a mistura reacional foi armazenada em um refrigerador e mantida a $\pm -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 24 horas. Após esse período, foi preparada uma solução de 6 g de ácido monocloroacético em 20,00 mL de álcool iso-propílico, e adicionada gota a gota sobre a mistura reacional com agitação magnética constante e armazenada no refrigerador por aproximadamente 24 horas a $\pm -5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após essa etapa, a reação foi finalizada com a adição de 200,0 mL de álcool etílico 80%. O produto formado foi filtrado, lavado com álcool etílico 80% e seco a vácuo por 3 horas (CHEN *et al*, 2003).

Foram realizados quatro experimentos, variando a massa do ácido monocloroacético ($1,0\text{ mol L}^{-1}$, $1,5\text{ mol L}^{-1}$, $2,5\text{ mol L}^{-1}$ e $5,0\text{ mol L}^{-1}$ de ácido monocloroacético em relação a massa de quitosana) (Tabela 3), mantido constante a quantidade de quitosana e hidróxido de sódio, e ajustado a quantidade de álcool iso-propílico conforme a quantidade de ácido monocloroacético utilizado no experimento.

Tabela 3: Variação da quantidade de ácido monocloroacético na síntese do CMQT.

Experimentos	Ácido monocloroacético
1 ($1,0\text{ mol L}^{-1}$)	4 g
2 ($1,5\text{ mol L}^{-1}$)	6 g
3 ($2,5\text{ mol L}^{-1}$)	10 g
4 (5 mol L^{-1})	20 g

A partir da obtenção do CMQT, com melhor grau de carboximetilação, os experimentos para a obtenção do CMQT-BZ foram realizados.

4.2.3. Síntese do Carboximetilquitosana-bz

Em um balão de 500 mL contendo 133 mL de água ultrapura foi adicionado 1,32 g de carboximetilquitosana e mantido sob agitação magnética (1000 rpm) a 25 °C. Em seguida uma solução contendo 2,1 mL de benzaldeído e 15 mL de metanol foi adicionada, gota a gota, sobre a solução contendo o CMQT. Metanol foi adicionado em seguida para tornar homogênea a mistura reacional.

A reação foi mantida sob agitação magnética (1000 rpm) a 25 °C por aproximadamente 24 horas. Após esse período, foi preparada uma solução de 0,67 g de borohidreto de sódio em 17,7 mL de água ultrapura ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) e adicionada gota a gota sobre a mistura reacional, mantendo a agitação magnética constante. Por fim, foi utilizada acetona para a precipitação, filtração e lavagem. O produto final foi seco em dessecador (RABEA *et al*, 2005; DEBRASSI *et al*, 2012; MOHAMEDA *et al*, 2013).

Foram realizados três experimentos (Tabela 4), variando o volume do benzaldeído, e mantendo constantes as quantidades de borohidreto de sódio (0,67 g) e a quantidade de CMQT (1,3 g).

Tabela 4: Variação da quantidade de benzaldeído na síntese do CMQT-BZ.

Experimentos (Concentração em relação ao CMQT)	Benzaldeído
2,5/1 mol L^{-1}	2,11 mL
3,5/1 mol L^{-1}	2,95 mL
4,5/1 mol L^{-1}	3,90 mL

4.2.4. Síntese do Acetoxi DMU

Primeiramente foi realizada a síntese do sal de diazônio e do catalisador (tris (dibenzilidenoacetona) dipaládio (0)), sendo estes os precursores para a obtenção do princípio ativo Ac.DMU.

4.2.4.1. Sal de Diazônio

O sal de diazônio é um importante intermediário em sínteses orgânicas, e sua obtenção está indicada na Figura 17.

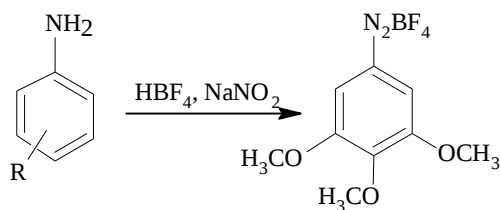


Figura 17: Reação de formação do sal de diazônio.

Em um béquer contendo 4,5 g de anilina, foi adicionado lentamente 11,9 mL de ácido tetrafluoroborônico e mantido sob 0 °C, logo em seguida, adicionado 7,6 mL de éter sobre a mistura. Após, foi dissolvido 2,1 g de nitrito de sódio em 9,0 mL de água e vertido lentamente na solução anterior, mantida a uma temperatura de -3 °C por 30 minutos. Um precipitado foi formado, filtrado e lavado com uma solução gelada de metanol/dietil éter (1:4). O sólido obtido foi filtrado e recristalizado em acetona e éter.

4.2.4.2. Tris (dibenzilidenoacetona) dipaládio (0) – Pd₂(dba)₃.dba

Em um erlenmeyer, preparou-se uma solução de dba (1,95 g), acetato de sódio (1,7 g) e metanol (65,0 mL). A temperatura de 50 °C adicionou-se o acetato de paládio (0,561 g). A mistura foi agitada por 4 horas a 40 °C, e o precipitado formado foi filtrado e lavado com água, acetona e seco sob vácuo. Obteve-se 1,3 g (90 %) do produto desejado como um sólido escuro. Com ponto de fusão entre 155-156 °C, correspondente ao reportado na literatura, entre 152-155 °C (MORO, 2010).

4.2.4.3. Reação de Heck-Matsuda

Através da reação de Heck-Matsuda é possível obter o princípio ativo Ac. DMU, o qual está representado na Figura 18.

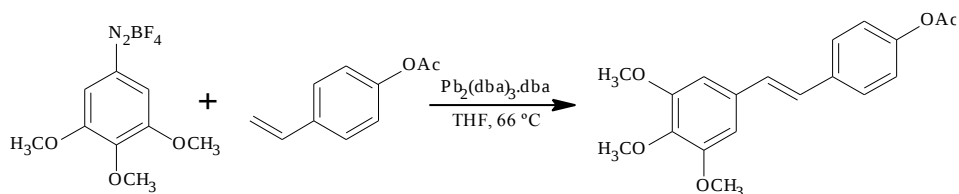


Figura 18: Reação de formação do 1,2,3-trimetóxi-5-(4-acetoxiestiril)benzeno, Ac.DMU.

Em um balão contendo uma barra de agitação magnética foi adicionado 0,0714 g do catalisador tris (dibenzilidenoacetona) dipaládio (0), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$.dba, 0,8250 g de acetato de sódio e 20,4 mL do solvente tetraidrofurano (THF). Essa mistura reacional foi imersa em um banho de óleo aquecido a uma temperatura de 66 °C e em seguida, foi adicionado 0,4959 g do estireno apropriado e 1,1 g do sal de diazônio. Após ocorrer a total liberação de gás nitrogênio, a reação foi finalizada. A mistura reacional foi filtrada em um *plug* de sílica, com eluente foi usado o acetato de etila, o solvente foi removido à pressão reduzida. O bruto reacional foi purificado em coluna cromatográfica “flash” utilizando o hexano:acetato etila (80:20) como eluente (MORO, 2010).

4.2.5. Síntese das Nanoesferas Poliméricas Magnéticas

As nanoesferas poliméricas magnéticas foram obtidas a partir do método emulsão difusão do solvente. Inicialmente, foi preparada a fase orgânica que consistiu na solubilização do princípio ativo e do polímero (CMQT ou CMQT-BZ) em uma mistura de 8 mL de acetato de etila com 5 mL de água ultrapura. Em seguida as NPsM foram dispersas à fase orgânica e misturadas com um bastão de vidro (essa etapa não foi realizada para a obtenção das nanoesferas poliméricas). Em paralelo a fase aquosa foi preparada, em um béquer adicionando 8 mL de água ultrapura e 1 mL do tensoativo Tween 80. Essa solução foi sonicada por 2 minutos. A fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa e sonicada por 8 minutos. Durante o processo de sonicação foram adicionados 3 mL de água ultrapura, provocando a difusão do solvente orgânico à fase aquosa e a sua evaporação, permanecendo as nanoesferas dispersas na solução aquosa. Por fim, foi realizada a liofilização (SOUTO *et al*, 2012; LAI *et al*, 2014). Um esquema do processo de obtenção das nanoesferas poliméricas magnéticas pode ser observado na Figura 19. Para a obtenção das nanoesferas foi variado a massa do fármaco, o polímero utilizado e a adição ou não de NPsM (CoFe_2O_4) à fase orgânica, a Tabela 5 sumariza essas variações.

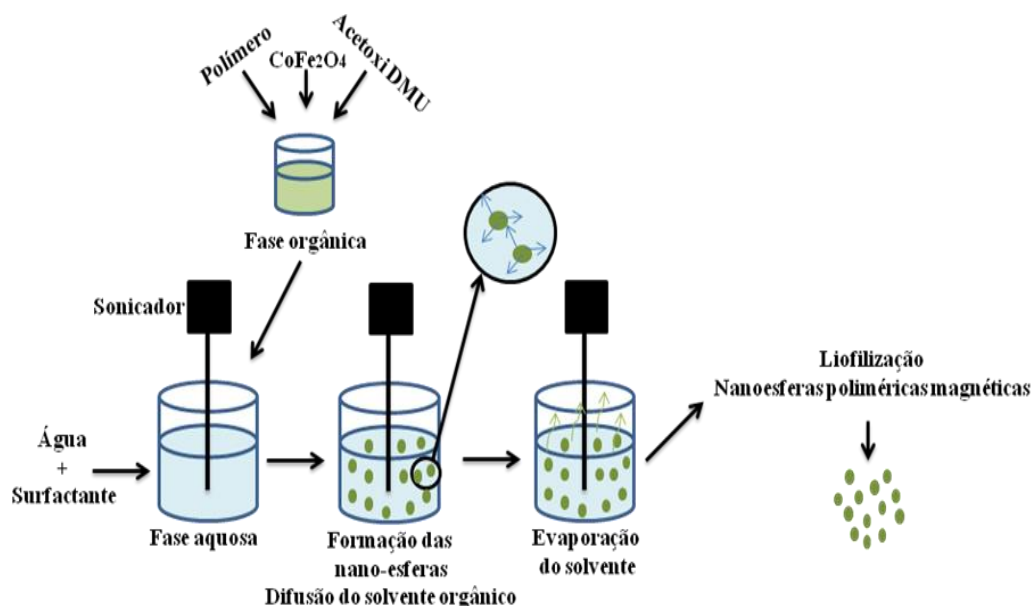


Figura 19: Representação do processo de obtenção das partículas poliméricas magnéticas contendo fármaco. Fonte: LAI et al (2014)

Tabela 5: Materiais utilizados para obtenção das nanoesferas poliméricas magnéticas.

Experimentos	Polímero (mg)	CoFe ₂ O ₄ (mg)	Acetoxi DMU
1º CMQT	30	-	1%, 3%, 6%
2º CMQT	30	25	1%, 3%, 6%
3º CMQT-BZ	30	-	1%, 3%, 6%
4º CMQT-BZ	30	25	1%, 3%, 6%

*1%, 3% e 6% da massa do Ac.DMU em relação à massa do polímero utilizado na síntese.

4.2.6. Validação do Método Analítico para o Acetoxi DMU por Espectrofotometria UV-Vis

Para a validação do método analítico foram utilizados o fármaco Ac.DMU, álcool metílico, água ultrapura, os polímeros CMQT e CMQT-BZ. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro UV-Vis FEMTO.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão concordantes com as normas estabelecidas pela *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e pela RE n° 899/03 da ANVISA (ANVISA, 2003).

Inicialmente foram realizados testes de solubilidade do fármaco em água, hexano, diclorometano, álcool etílico, álcool metílico, água/álcool etílico v/v 50:50, água/álcool metílico v/v 50:50, à 25 °C, para a definição da melhor solução diluente. Para tal, levou-se em consideração o poder de solubilização do fármaco, custo e toxicidade do solvente.

4.2.6.1. Preparo das Amostras

Para o preparo da solução estoque da amostra, 50 mg de Ac.DMU foi solubilizado em 20 mL de uma mistura de água ultrapura/álcool metílico (50:50 v/v). Essa solução resultante foi adicionada a um balão volumétrico de 50 mL e completado com a mistura de água ultrapura/álcool metílico, para atingir uma concentração de 100 µg/mL. A partir desta solução estoque foram preparadas as diluições necessárias. Após o preparo, todas as soluções foram filtradas para leitura das amostras. Diante disso, realizou-se a varredura na faixa de 200 a 800 nm para identificar o comprimento de onda de máxima absorção do Ac.DMU.

4.2.6.2. Linearidade

O conceito de linearidade resume-se na capacidade de se obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, dentro de um determinado intervalo, esse intervalo é de escolha do analista ou estudos anteriores realizados (IUPAC, 2002; ICH, 2005).

A linearidade foi determinada a partir de soluções de Ac.DMU, por meio de uma curva padrão nas concentrações de 2, 6, 10, 14, 18, 22 µg/mL. Cada concentração foi realizada em triplicata. O coeficiente de correlação foi obtido através da regressão linear, pelo método de mínimos quadrados. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 315 nm, e os resultados foram tratados utilizando software Minitab 17.

4.2.6.3. Limite de Detecção

O LD pode ser determinado utilizando a equação linear da curva de calibração da amostra ($Y = a + bx$), através do valor obtido para o coeficiente angular (b) e a

variância residual (S) determinados pelo cálculo do desvio padrão de um número adequado de amostras em branco, conforme a Equação 2 (IUPAC, 2002; ICH, 2005):

$$LD = Sx \frac{3,3}{b} \quad (2)$$

Obs. O valor de 3,3 refere-se a uma constante numérica calculada de acordo com o nível de confiança exigido.

4.2.6.4. Limite de Quantificação

O LQ é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada, quantitativamente, com precisão e exatidão adequadas (ICH, 2005). O LQ pode ser determinado através da equação linear da curva de calibração da amostra ($Y = a + bx$), utilizando os valores obtidos para o coeficiente angular (b) e a variância residual (S), determinados pelo cálculo do desvio padrão de um número adequado de amostras em branco de acordo com a Equação 3 (ICH, 2005):

$$LD = Sx \frac{10}{b} \quad (3)$$

4.2.6.5. Exatidão (método de recuperação)

A exatidão de um procedimento analítico resume-se no grau de concordância entre o valor que é aceito como verdadeiro convencional (ou um valor de referência aceito) e o valor encontrado do analito (IUPAC, 2002; ANVISA, 2003 ICH, 2005).

A exatidão foi determinada a partir de ensaios de recuperação de três concentrações conhecidas da amostra: 2, 10 e 22 $\mu\text{g/mL}$, mínimo, médio e máximo. O procedimento foi realizado em triplicata e em dois dias diferentes. Posteriormente as amostras foram analisadas e as concentrações foram recalculadas através da curva de calibração e, por fim, foram comparadas as concentrações obtidas com as concentrações teóricas.

4.2.6.6. Precisão

A análise da precisão de um método analítico expressa o grau de concordância entre as várias medidas obtidas a partir da amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea nas condições prescritas (IUPAC, 2002; INMETRO, 2003; ICH, 2005). Foram analisados os níveis de precisão: precisão intermediária (ensaios em dias diferentes) e repetibilidade (diferentes ensaios no mesmo dia). Para todos os níveis foram realizadas seis varreduras de três soluções com concentração de Ac.DMU conhecida (2, 10 e 22 µg/mL). Os níveis de precisão foram determinados pelo desvio padrão relativo percentual (DPR %) dos resultados obtidos nas curvas analíticas.

4.2.7. Determinação da Recuperação Percentual do Acetoxi DMU

A determinação da recuperação percentual é realizada para identificar possíveis perdas operacionais que podem ocorrer durante o experimento. Para que seja possível determinar o valor real da eficiência de encapsulação é preciso verificar a quantidade do princípio ativo encapsulado em função do valor final, ou seja, a concentração real de Ac.DMU presente na amostra.

Para a obtenção do valor de recuperação percentual foi coletado 1 mL da dispersão formada em cada experimento e seco em estufa a 70 °C, por duas horas. Em seguida, as alíquotas secas foram diluídas em 2 mL da mistura de água/metanol, filtradas, e coletados 1 mL desses filtrados, e adicionados a um balão de 10 mL e o volume aferido com solvente (água/metanol 1:1 v/v). Em seguida, foi determinada a absorbância das diluições, em 325 nm, sendo a porcentagem de recuperação determinada pela curva de calibração e com auxílio da Equação 4.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{[\text{Ac.DMU}]_{\text{real}}}{[\text{Ac.DMU}]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (4)$$

A concentração real é a concentração de Ac.DMU presente na dispersão ao final do experimento de obtenção das nanoesferas, a concentração inicial é a concentração de Ac.DMU adicionada no início do experimento de obtenção das nanoesferas.

4.2.8. Eficiência de Encapsulação (EE, %)

A concentração real do Ac.DMU, presente na dispersão final das nanoesferas, foi obtida através do procedimento anterior, não obstante, esses valores não indicam se o Ac.DMU se encontra encapsulado ou disperso em água. Para sanar essa dúvida foi necessário determinar a eficiência de encapsulação a qual indica a quantidade de Ac.DMU incorporado ou adsorvido na superfície das nanoesferas.

Para obter a EE (%), uma alíquota de 0,5 mL de cada um dos experimentos realizados foi coletada, filtrada e centrifugada a 3.000 rpm por 1 hora. O filtrado obtido foi seco em estufa à 70 °C por 24 horas. Essas amostras secas foram diluídas em 2,0 mL da mistura de água/metanol e uma alíquota de 1, mL foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e aferido o volume com a mistura de solventes (água/metanol 1:1 v/v). Logo após, foi determinado a absorbância das diluições, em 325 nm, sendo a EE (%) calculada pela Equação 5.

$$EE(\%) = \left(\frac{[Ac.DMU]_{real} - [Ac.DMU]_{não\ encapsulada}}{[Ac.DMU]_{real}} \right) \times 100 \quad (5)$$

A concentração real de Ac.DMU é aquela ao final do experimento de obtenção das nanoesferas e concentração não encapsulada é a concentração que não foi incorporada ou adsorvida na superfície das nanoesferas e calculadas através da curva de calibração.

4.3. Métodos de Caracterização

4.3.1. Difração de Raios X (DRX)

As amostras foram analisadas pelo equipamento da marca Bruker, modelo D2 phaser, com radiação de $CuK\ \alpha$ ($\lambda=1,5418\text{\AA}$) e detector Lynxeye, voltagem de 30kV e corrente de mA. A varredura foi realizada de 15 ° a 80° em 2θ , e passo de 0,05° por segundo. Essa análise foi realizada na Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO-PR pela professora Eryza Guimarães.

4.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz, (Dynamic Light Scattering (DLS)), mede movimentos brownianos, e os relaciona com o tamanho da partícula analisada. Portanto, à mesma temperatura, partículas maiores vão se movimentar mais lentamente que as partículas menores.

Para analisar o tamanho médio das NPsM, das nanoesferas poliméricas magnéticas e das nanoesferas poliméricas foi utilizado o equipamento da Malvern Instruments, ZETANANOSIZER. As análises foram realizadas a 20 °C, usando água ultrapura para NPs poliméricas e hexano para NPsM como dispersante. As análises foram realizadas na Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO-PR.

4.3.3. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das diferentes amostras foram obtidos através do aparelho Vertex da Bruker 70, com reflectância atenuada ATR. Os espectros foram feitos com 16 scans e resolução de 4 cm⁻¹. As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina no Laboratório de Química Prebiótica do Prof. Dr. Dimas Zaia.

4.3.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TG/DTA)

As amostras foram analisadas em um equipamento de Análise Térmica (TG/DTA/DSC), da marca TA Instruments, modelo SDT Q600. Condições utilizadas: temperatura inicial e final de 25 °C e 800 °C, respectivamente, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio a 20 mL/min. As análises foram realizadas na Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO-PR pelo Prof. Dr. Ricardo Y. Miyahara.

4.3.5. Magnetômetro de Amostra Vibrante (VSM)

As medidas de magnetização de saturação foram obtidas à temperatura ambiente, por meio de um magnetômetro Quantum Design PPMS Evercool II (magnetômetro de amostra vibrante VSM (Vibrating Sample Magnetometer)). Todas as

medidas foram realizadas em um campo magnético máximo de 90 kOe (9 Tesla), e taxa de varredura máxima de 250 Oe/s. As análises foram realizadas na Universidade Federal do Paraná no Laboratório de Caracterização Magnética de Materiais pelo Prof. Dr. Dante Mosca.

4.3.6. ZFC (Zero Field Cooled) e FC (Field Cooled)

As propriedades magnéticas foram avaliadas via curva de magnetização versus temperatura, ZFC-FC. A temperatura foi variada de 5 a 400 K, e o campo mantido a 500 Oe. As análises foram realizadas na Universidade Federal do Paraná no Laboratório de Caracterização Magnética de Materiais pelo Prof. Dr. Dante Mosca.

4.3.7. Titulação Condutimétrica

A titulação condutimétrica foi utilizada para analisar a porcentagem de carboximetil inserido na matriz polimérica da quitosana. Para a análise condutimétrica foi utilizado um condutivímetro LT Lution Conductivity Meter CD-4301, com uma escala de 2-20 mS. As medidas foram realizadas a 25 °C. Através da Equação 6 foi calculado o grau de carboximetilação.

$$\%CH_2COO = \frac{V_2 - V_1 \times 5,8}{m} \times 100 \quad (6)$$

Onde V_1 e V_2 são os volumes (L) do titulante no primeiro e segundo pontos de inflexão; 5,8 é o equivalente em massa correspondente a 0,1 mEq de CH_2COO^- ; m é a massa (g) da amostra utilizada na titulação.

4.3.8. Titulação Potenciométrica

A porcentagem de grupos amino remanescente nas amostras de quitosana e nas amostras de carboximetilquitosana foi determinada por titulação potenciométrica. Para a análise potenciométrica foi utilizado um pHmetro W3B pH METER da Bel Engineering. A Equação 7 foi utilizada nos cálculos:

$$\%NH_2 = \frac{M_{NaOH}(V_2 - V_1)161}{m} \times 100 \quad (7)$$

Onde, M_{NaOH} é concentração da solução de NaOH (mol/L); V_1 e V_2 são os volumes (L) de NaOH; 161 é a massa molecular da unidade monomérica da quitosana; m é a massa (g) da amostra utilizada para a titulação. Através da Equação 8 foi calculado o grau de desacetilação GD (NH_2 livre). Para calcular o grau de acetilação GA (grupo acetoamido livre) foi usada a Equação 6:

$$\%GA = 100 - GD \quad (8)$$

4.3.9. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H)

Os espectros de RMN 1H das amostras de quitosana, CMQT e CMQT-BZ, foram obtidos pelo equipamento ASCEND 400 MHz da Bruker, nas condições: 32 scans, TD = 65 k, SW = 10 ppm e solvente D_2O/HCl (100/1 v/v). As amostras foram analisadas na Universidade Estadual de Londrina pelo doutorando Pedro Anizelli. Para o cálculo do grau de substituição do carboximetilquitosana-bz foi utilizada a Equação 9:

$$\%GS = \frac{(Al \ ^1HAr \approx 7,0 \text{ ppm})}{(Al \ ^1HC_2 \approx 3,0 \text{ ppm})} \times \frac{(1)}{(N \ ^1HAr)} \quad (9)$$

$Al \ ^1HAr$ corresponde a área da integral dos hidrogênios aromáticos próximos a 7,00 ppm; $Al \ ^1HC_2$ corresponde a área da integral dos hidrogênios ligados ao C_2 , próximos a 3,00 ppm e $N \ ^1HAr$ corresponde ao número de prótons ligados ao anel aromático.

O espectro de RMN 1H do Ac.DMU foi obtido pelo equipamento ASCEND 250 MHz da Bruker. O solvente utilizado para as análises foram o $CDCl_3$. As amostras foram analisadas na Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, em São Paulo.

4.3.10. Potencial Zeta

As análises de potencial zeta oferecem informações sobre a carga superficial das nanopartículas. As medidas de potencial zeta das amostras foram realizadas no

equipamento da Malvern Instruments, ZETANANOSIZER, localizado na Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO-PR.

4.3.11. Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia na região do UV-Visível foi utilizada para a validação do método para o Ac.DMU. Foi utilizado um espectrofotômetro 800XI da FEMTO. As análises foram realizadas na Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO-PR no Laboratório de Pesquisas em Ciências Interfaciais (LAPECI) do Prof. Dr. Carlos Alberto Policiano Almeida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, os resultados obtidos foram divididos em quatro partes. Na primeira parte são apresentados e discutidos os resultados sobre a caracterização estrutural e composicional, bem como a surfactação da superfície e as propriedades magnéticas das NPsM de CoFe_2O_4 . Na segunda parte são mostrados e discutidos os resultados sobre a modificação superficial e inserção de novos grupos na molécula de quitosana para a obtenção de derivados possíveis de utilização como polímeros de revestimento para sistemas nanoestruturados, também foi apresentado o resultado para o Ac.DMU obtido pela síntese de Heck-Matsuda. Na terceira parte são exibidos e discutidos os resultados obtidos para o diâmetro e a carga superficial dos coloides, nanoesferas poliméricas magnéticas e nanoesferas poliméricas. Por fim, na quarta parte são apresentados e discutidos os resultados para a validação do método analítico para o Ac.DMU, assim como a avaliação da eficiência de encapsulação do fármaco às nanoesferas poliméricas magnéticas e às nanoesferas poliméricas.

5.1. Nanopartículas Magnéticas de Ferrita de Cobalto

O material obtido através da síntese de coprecipitação pode ser observado na Figura 20.



Figura 20: NPsM de CoFe_2O_4 obtida pelo método de coprecipitação, em pó e em meio dispersante.

Conforme resultados obtidos nas caracterizações foi possível observar que a variação da agitação mecânica de 600 para 1000 rpm (Tabela 6) apresentou uma pequena relevância na obtenção das partículas. No entanto, quanto maior a agitação menor o tamanho da partícula. A literatura apresenta variações na ordem de 2700 rpm a 8100 rpm, indicando partículas menores com agitações mais elevadas (MORAIS *et al*, 2001).

A variação de temperatura da solução de cobalto e ferro de 80 °C para 90 °C apontou uma influência significativa nos resultados, maior a temperatura, ocorreu a surfactação das partículas, menor a temperatura, não ocorreu e/ou ocorreu uma menor surfactação das partículas com o AO.

As cinco diferentes amostras de ferritas de cobalto foram analisadas pela difratometria de Raios X (DRX) e através do software Origin versão 8.0 foi possível calcular a largura a meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade (35,45°, 311). A Tabela 6 aponta os valores obtidos.

Tabela 6: Largura a meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade (35,45°, 311) das amostras de CoFe_2O_4 .

Amostras	Largura a meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade
CoFe_2O_4	0,66289
$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO-80/600}$	0,68542
$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO-90/600}$	0,69233
$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO-80/1000}$	0,71985
$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO-90/1000}$	0,75064

*80 e 90: temperaturas utilizadas nas rotas sintéticas.

*600 e 1000: agitação mecânica utilizadas nas rotas sintéticas.

Os valores obtidos de largura a meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade (35,45°, 311) (Tabela 6) seguem uma tendência e podem ser relacionados com os valores obtidos pela técnica de DLS, os quais estão condizentes para as três amostras analisadas por DLS. Quanto maior o valor da largura a meia altura, menor é o tamanho da partícula, indicando picos largos e de pequena intensidade, e quanto menor o valor da largura a meia altura, maior é o tamanho da partícula, indicando picos mais finos e intensos. Portanto, a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO-90/1000}$ foi a que apresentou maior

largura a meia altura (FWHM) e menor diâmetro médio aparente quando analisada por DLS.

Os DRX das amostras de CoFe_2O_4 com AO e sem AO são apresentados nas Figuras 21a e 21b. A fase cristalina e os parâmetros de difração foram identificados por comparação com os dados padrões do JPCDS 00-022-1086 e JPCDS 01-074-3419. Podem ser observados os picos de difração à 2θ , em $18,32^\circ$; $30,13^\circ$; $35,45^\circ$; $37,13^\circ$; $43,14^\circ$; $57,13^\circ$; $62,65^\circ$, equivalentes aos índices de Miller (h, k, l), (111), (220), (311), (222), (400), (511), (440), respectivamente, característicos da ferrita de cobalto magnética (FRANJI *et al*, 2010).

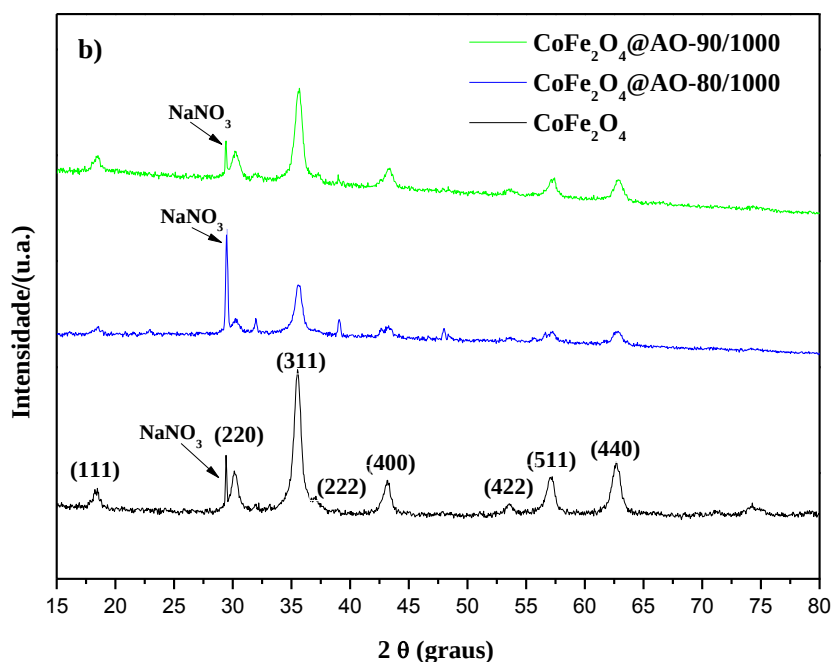
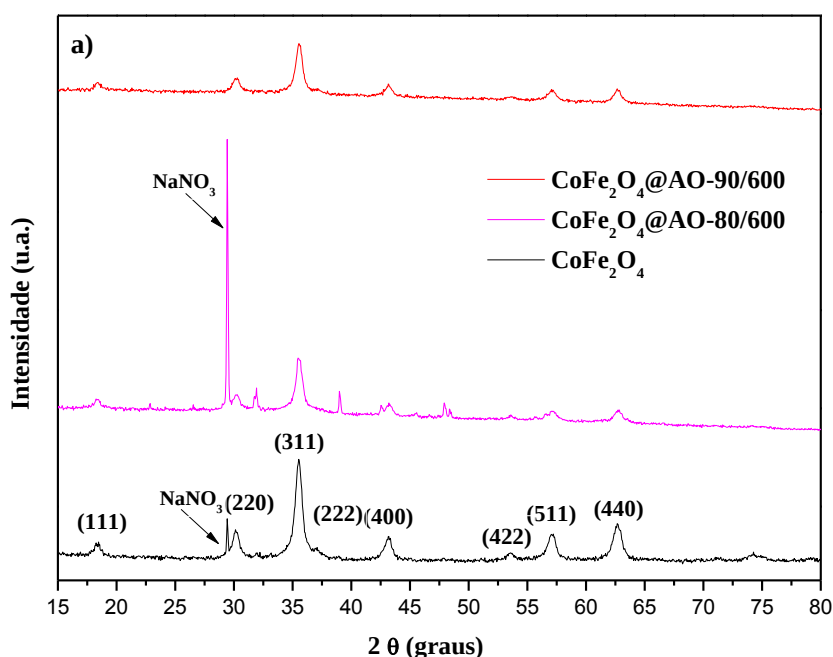


Figura 21: Difratoformas de DRX dos produtos de síntese por coprecipitação (a) síntese com agitação mecânica de 600 rpm e (b) síntese com agitação mecânica de 1000 rpm.

Os parâmetros de DRX indicam a formação de picos bem definidos da fase cristalina confirmando a estrutura cúbica de espinélio parcialmente inverso, ou seja, tanto os sítios tetraédricos quanto os sítios octaédricos são ocupados por cátions Fe^{3+} e por cátions Co^{2+} . A presença do AO não interferiu na cristalinidade e na formação da CoFe_2O_4 , pois os picos das amostras sintetizadas com AO são condizentes com a ferrita de cobalto sem AO.

Nas Figura 21a e 21b foram observados picos de impurezas, principalmente nas amostras CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/600}$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$, esses picos de difração em $29,37^\circ$, $31,86^\circ$ e $47,91^\circ$ (JPCDS 00-036-1474) correspondentes aos índices de Miller (104), (006) e (018) são característicos do nitrato de sódio. Isso pode ser explicado pelo fato de ter sido utilizado ácido nítrico na rota sintética. O nitrato de sódio (NaNO_3) nas amostras ocorre devido ao processo ineficiente de lavagem para essas amostras.

Os diâmetros aparentes obtidos por DLS para três amostras de CoFe_2O_4 em suspensão podem ser observados na Figura 22. A amostra de CoFe_2O_4 (Figura 22a), apresentou um diâmetro médio aparente de 522,1 nm. O histograma da amostra apresenta uma distribuição variável de 91,28 nm (3,5%) a 1484 nm (0,1%), porém 93,1% das partículas apresentam tamanho aparentes de 146,6 nm. Para a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ (Figura 22b) o diâmetro médio aparente encontrado foi de 57,75 nm e o histograma mostra uma distribuição de tamanho aparente de 32,67 nm (2,1%) a 91,28 nm (0,1%), sendo que a maior parte das partículas encontram-se em 43,88 nm (30,1%) e 50,75 nm (30%).

Para a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ (Figura 22c) o diâmetro médio aparente obtido foi de 21,49 nm, com distribuição uniforme e tamanhos aparentes variando entre 15,69 nm (3%) e 28,21 nm (5,3%). Também pode ser observado que 91,7% das partículas apresentam tamanhos aparentes de 18,17 nm (41,7%) e 24,30 nm (50%). Essa variação de tamanho aparente de uma amostra para outra pode estar relacionada a surfactação das partículas com AO ou não surfactação, como será observado no espectro de FTIR, comprovando que o AO proporciona estabilidade e limita a aglomeração das NPsM.

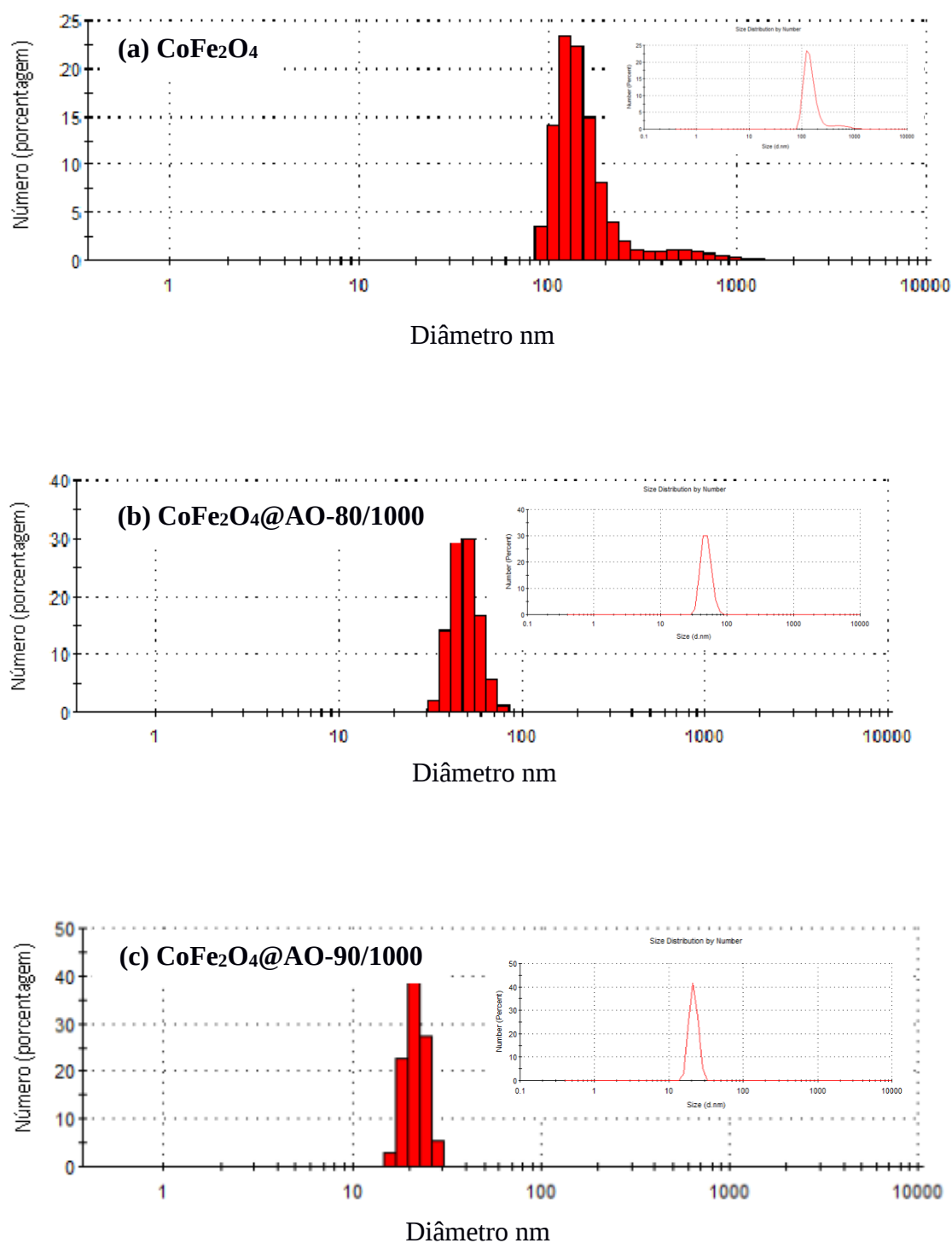


Figura 22: Histogramas de distribuição dos tamanhos das nanopartículas (a) CoFe_2O_4 (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$.

A literatura apresenta valores de D_C entre 15 a 70 nm para NPs de CoFe_2O_4 (KARIMI *et al*, 2013), sendo assim, as amostras sintetizadas com AO encontram-se dentro da faixa de D_C . Entretanto, os resultados estimados por DLS são um tanto

elevados para a amostra sem AO. Uma explicação para esses valores elevados pode estar na formação de clusters devido às interações magnéticas dipolo-dipolo entre as partículas formando aglomerados, mostrado no histograma através de uma distribuição alargada ou pode estar relacionado a sobreposição das partículas maiores em relação às menores, pois o método de coprecipitação origina partículas de diversos tamanhos, e a técnica de DLS mede o tamanho médio das partículas maiores. Foi analisado também o potencial zeta (PZ) para as amostras expostas ao AO e os valores obtidos foram os seguintes, para a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/600}$ -8,8 mV, para a $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ -13,4 mV, para a $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ -9,2 mV e para a $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ -19,8 mV, pode-se concluir que a última amostra possui melhor estabilidade em relação as outras, pois valores de PZ mais elevados apontam dispersões mais estáveis, as partículas carregadas repelem umas às outras e essas forças de repulsão superam as forças de Van der Waals, responsáveis pela agregação do material.

A fim de confirmar se o material formado foi a CoFe_2O_4 , bem como se ocorreu a surfactação com AO, foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A Figura 23 aponta os espectros de infravermelho das diferentes amostras no comprimento de onda de 4000 a 2000 cm^{-1} e 2000 a 600 cm^{-1} . A Tabela 17 (anexo) sumariza as características observadas nos espectros de todas as amostras.

O espectro na região do infravermelho do AO (Figura 23b) apresentou bandas características em 3006 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , relativas ao estiramento C–H do grupamento $\text{CH}-(\text{C}=\text{C})$ (insaturação cis presente no AO), do estiramento assimétrico do CH_2 e do estiramento simétrico do CH_2 , respectivamente. Próximo a 1708 cm^{-1} encontra-se uma das bandas mais importantes do AO, referente ao estiramento C=O (banda da carbonila presente na ponta da molécula). Em 1463 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} foram observadas bandas referentes aos estiramentos C–O e COO^- , respectivamente. A banda na região de 1310 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento COOH ; e a banda próxima à região de 960 cm^{-1} refere-se à deformação angular do C=O. Na região de 722 cm^{-1} a banda é atribuída ao grupamento $\text{CH}=\text{CH}$ presente na estrutura da molécula orgânica (AYYAPPAN *et al*, 2011; DEY *et al*, 2014).

As diferentes amostras de CoFe_2O_4 pura (Figura 23a) e surfactadas (Figura 23c, 23d, 23e e 23f) apresentaram uma banda intensa em torno de 3350 cm^{-1} , atribuída ao estiramento O–H da molécula de água presente na CoFe_2O_4 . Em torno de 1620 cm^{-1} a banda é referente à deformação angular da molécula de água H–O–H, caracterizando a

presença de água livre ou adsorvida na superfície das NPsM (AYYAPPAN *et al*, 2011; HABIBI *et al*, 2014). As bandas presentes na região em torno de 2350 cm^{-1} ocorrem devido à deformação angular de moléculas de CO_2 . Também foram observadas bandas próximas a 2430 cm^{-1} , 1780 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} e 830 cm^{-1} , que podem ser referentes ao nitrato de sódio (NaNO_3) (MILLER e WILKINS, 1952; LIU *et al*, 2005) presente nas amostras devido a lavagens insuficientes, demonstrado no DRX que a maioria das amostras apresentaram pico de NaNO_3 , apenas a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ (Figura 23d) não apresentou este pico e a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ (Figura 23f) apresentou pico de baixa intensidade. A única amostra que não apresentou bandas referentes ao nitrato de sódio foi a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$, significando que essa amostra maior grau de pureza (MILLER e WILKINS, 1952).

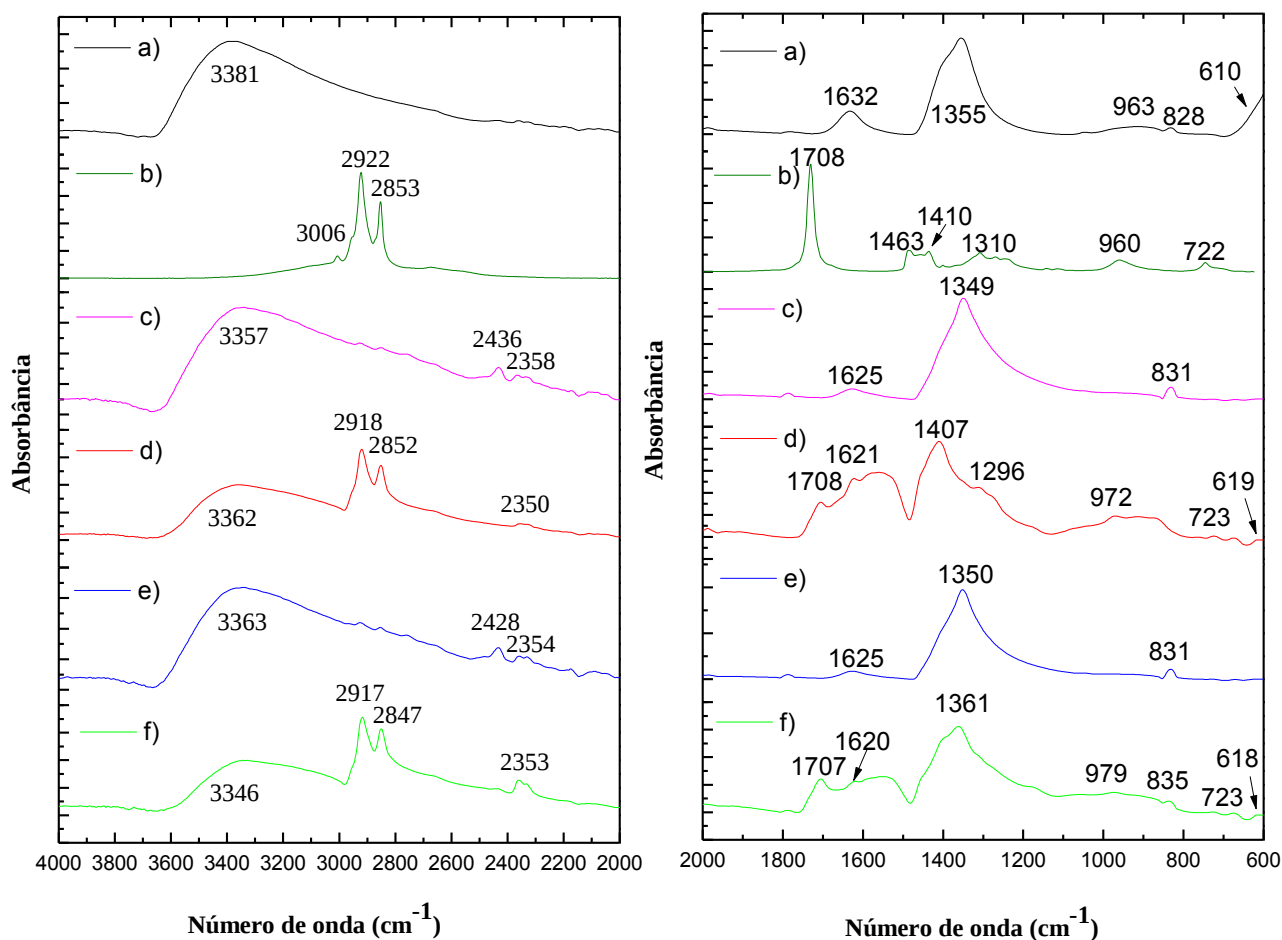


Figura 23: Espectros na região do infravermelho (a) CoFe_2O_4 , (b) AO, (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/600}$ (d) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$, (e) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$, (f) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$.

As bandas presentes próximo a região de 970 cm^{-1} podem ser atribuídas às ligações Fe-Co das NPs e estão presentes nas amostras de CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$. Também é notável a presença de bandas de baixa intensidade na região de 620 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento do metal-oxigênio (Me–O) (Me= Fe, Co), presentes nos sítios tetraédricos das NPs. Os sítios octaédricos não foram identificados devido a varredura ocorrer de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , e a banda de identificação dos grupos octaédricos ocorrer na região de 400 cm^{-1} a 480 cm^{-1} (RANA *et al*, 2010; YUAN *et al*, 2010).

Analisando os espectros das amostras $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/600}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$ (Figura 23c e 23e) observa-se a existência de bandas de baixa intensidade, características de AO, podendo ser excesso do AO que não reagiu e ficou presente nas amostras. No entanto, existem bandas intensas características da ferrita de cobalto sem AO, indicando que pode não ter ocorrido ou ocorrido uma menor surfactação.

Para confirmar que não houve a surfactação, foi adicionada uma pequena quantidade de amostra de NPs ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$) em um tubo de ensaio contendo água (polar) e hexano (apolar). As NPs se dispersaram na água (Figura 24a), ou seja, as partículas permaneceram hidrofílicas, tais como a CoFe_2O_4 . Realizado o mesmo procedimento para a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ (Figura 24b), foi observado que as NPs se dispersaram na fase orgânica (hexano), caracterizando-as como partículas hidrofóbicas.

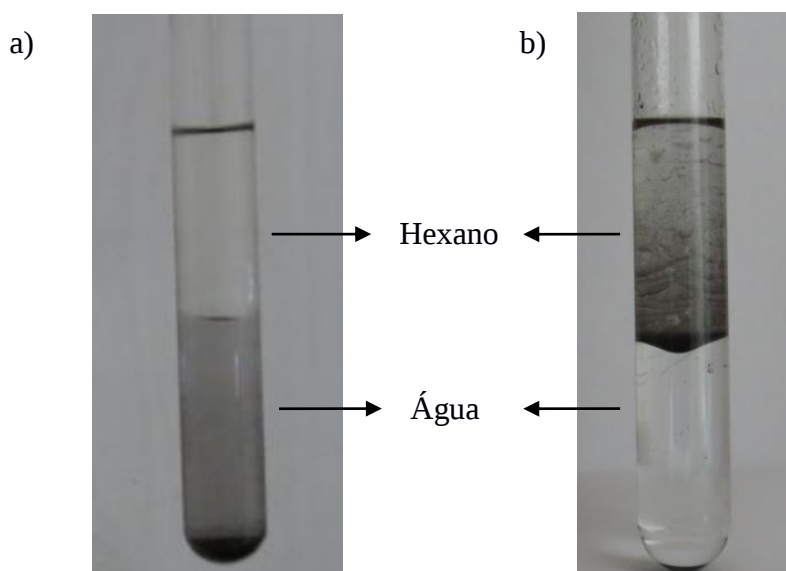


Figura 24: Amostras dispersas em água e hexano (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$, (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$.

As amostras $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ (Figura 23d e 23f) apresentaram fortes bandas em 2918 cm^{-1} e 2917 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} e 2847 cm^{-1} , devido ao estiramento de ligações assimétricas e simétricas do grupo CH_2 , respectivamente, ou seja, características da cadeia orgânica do AO. Também foi observado o aparecimento de bandas em 1708 cm^{-1} e 1707 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O devido ao AO adsorvido fisicamente na superfície ou coroa das NPs (HABIBI *et al*, 2014).

Na amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ (Figura 23d) foi observada a banda em 1407 cm^{-1} , referente ao estiramento simétrico do grupo COO^- , e da banda 1296 cm^{-1} , atribuída ao estiramento COOH . Essas bandas não apareceram no espectro da amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ (Figura 23f), porque elas estão superpostas pelas bandas de impurezas do NaNO_3 . Em 919 cm^{-1} e 927 cm^{-1} das amostras $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ apareceram bandas correspondentes à deformação angular do C=O ; a banda em 723 cm^{-1} é atribuída ao grupamento CH=CH , da molécula orgânica (AYYAPPAN *et al*, 2011; HABIBI *et al*, 2014).

Portanto, foi confirmada a obtenção da CoFe_2O_4 . E comparando os espectros das diferentes amostras é visível a incorporação de AO na superfície das amostras $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$. O mesmo não pode ser dito das amostras $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/600}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-80/1000}$. A ausência de AO nessas amostras está relacionada a temperatura de aquecimento das soluções de sais de ferro e cobalto, revelando a necessidade de temperaturas superiores a $80\text{ }^\circ\text{C}$ para essa rota sintética, para o AO recobrir a superfície da ferrita de cobalto.

Foram utilizadas as técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TG/DTA) para estudar as perdas de massa das amostras e confirmar a surfactação ou não das NPsM com o AO.

Os termogramas das Figuras 25 e 26 mostram perda de massa mais acentuada nas amostras $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO}$ do que na amostra CoFe_2O_4 . O termograma da amostra CoFe_2O_4 (Figura 25) mostra uma perda de 7,2% de massa entre $23\text{ }^\circ\text{C}$ e $151\text{ }^\circ\text{C}$, referente a água adsorvida no material. O evento endotérmico observado em $65\text{ }^\circ\text{C}$, na curva de DSC, comprova esse fato. A segunda perda de 5,6% de massa ocorre entre as temperaturas de $160\text{ }^\circ\text{C}$ e $302\text{ }^\circ\text{C}$, e pode ser atribuída aos grupos hidroxilas presentes nas superfícies das partículas (evento endotérmico na curva de DSC) com temperatura de pico (T_{pico}) em $275\text{ }^\circ\text{C}$ (RAJPUT e KAUR, 2013). A perda de massa entre $319\text{ }^\circ\text{C}$ e $609\text{ }^\circ\text{C}$ de 5,6% pode ser referente ao início da cristalização da ferrita de cobalto (BRICENO *et al*, 2012; RAJPUT e KAUR, 2013).

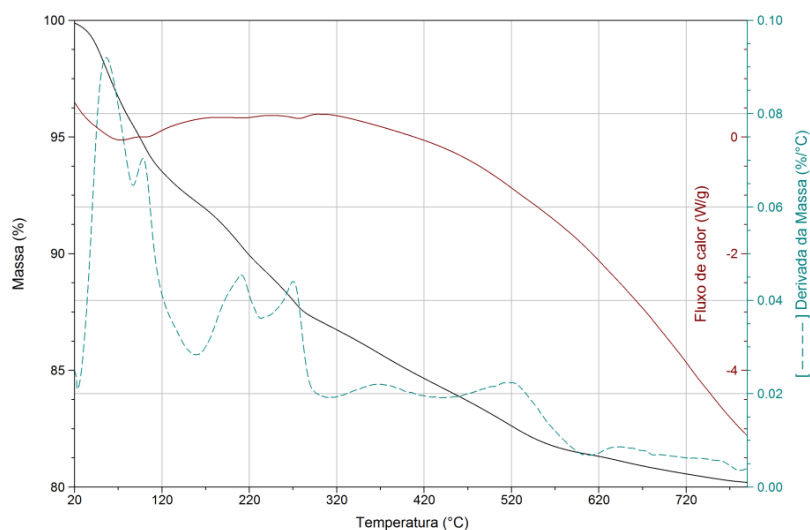


Figura 25: Termograma da amostra de CoFe_2O_4 .

O termograma da amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@-80/1000$ pode ser observado na Figura 26a. A perda de massa (9,2%) devido à evaporação da água adsorvida e também a evaporação de componentes voláteis ocorreu entre 29 °C e 125 °C. Esse evento também é indicado na curva de DSC que apresenta pico endotérmico a 75 °C. A segunda perda de massa é observada entre 168 °C e 272 °C, com perda de massa de 3,8%, devido aos grupos hidroxilas presentes na superfície das amostras. No DSC é observado um evento exotérmico com temperatura inicial em (T_{onset}) 196 °C e temperatura de pico 238 °C. Entre 539 °C e 625 °C ocorreu perda de massa de 13,9% referente ao início da cristalização da ferrita de cobalto (BRICENO *et al*, 2012)

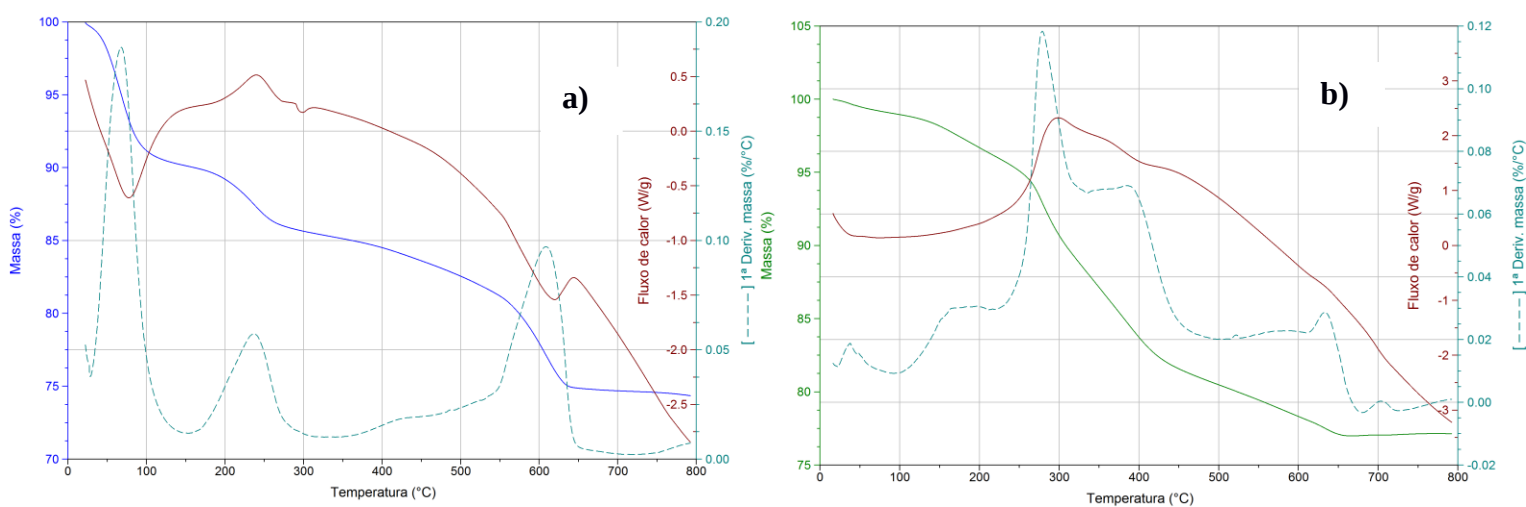


Figura 26: Termogramas das amostras (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@-80/1000$ (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@-90/1000$.

Na Figura 26b, os primeiros eventos ocorrem entre 20 °C e 93 °C, e correspondem a perda 1,17% de massa, e entre 109 °C e 210 °C, com perda 2,7% de massa. Esses eventos podem ser atribuídos a perda de H₂O adsorvida na superfície da partícula (MORIYAMA *et al*, 2014), componentes voláteis e de água estrutural, ao qual é confirmado pela curva de DSC com um evento endotérmico a T_{onset} 17 °C e T_{pico} 121 °C, comprovando a surfactação, pois AO repele a água. Já a perda 7,5% de massa entre as temperaturas de 226 °C e 473 °C corresponde à decomposição da molécula de AO. A curva de DSC evidencia a decomposição de AO, apresentando um evento endotérmico com T_{onset} 369 °C e T_{pico} 398 °C. Esse comportamento não é observado nos termogramas das amostras CoFe₂O₄ e CoFe₂O₄@AO-80/1000. Também apresenta perda 2 % de massa entre 609 °C e 774 °C, relativa ao início da cristalização da ferrita de cobalto (AYYAPPAN *et al*, 2011; BRICENO *et al*, 2013; MORIYAMA *et al*, 2014). Portanto, foi possível identificar, através do DSC e TG/DTA que houve a incorporação de AO na amostra CoFe₂O₄@AO-90/1000.

O comportamento magnético das amostras obtidas foi analisado pela curva de magnetização versus campo magnético aplicado (M x H) a temperatura ambiente. O campo magnético foi variado de -90 kOe a +90 kOe. Para a obtenção dos gráficos foi necessário conhecer a massa do material magnético utilizada em cada medida para, posteriormente, dividir pelos valores fornecidos pelo equipamento, e obter a magnetização em emu/g. A partir da curva variação de magnetização emu/g versus variação do campo magnético aplicado H, pôde-se determinar os valores de magnetização de saturação (M_s), magnetização remanente (M_r) e campo coercivo (H_c). Os valores estão listados na Tabela 7.

Todas as amostras apresentaram ciclo de histerese a temperatura ambiente (Figura 27), sugerindo um comportamento ferro/ferrimagnético (PARVEEN *et al*, 2012). Para que a ferrita de cobalto apresente propriedades superparamagnética, o diâmetro D_{sp} precisa estar entre 6 – 10 nm, ou um valor próximo, e valores de M_r e H_c irrelevantes (PARVEEN *et al*, 2012; KARIMI *et al*, 2013). Porém valores abaixo de 10 nm apresentaram pouca resposta magnética (YUAN *et al*, 2010). Ao comparar os resultados obtidas neste trabalho com aquelas reportadas na literatura é perceptível que as amostras obtidas apresentaram valores baixos de H_c e M_r, bem como moderada M_s, por exemplo, Amiri e Shokrollahi (2013), obtiveram valores de M_s 61,0 emu/g, H_c 419,0 Oe, M_r 15,25 emu/g e M_r/M_s 0,29, e Houshiar et al (2014) obtiveram valores de M_s 55,8 emu/g e H_c 850 Oe, valores bem superiores aos obtidos neste trabalho.

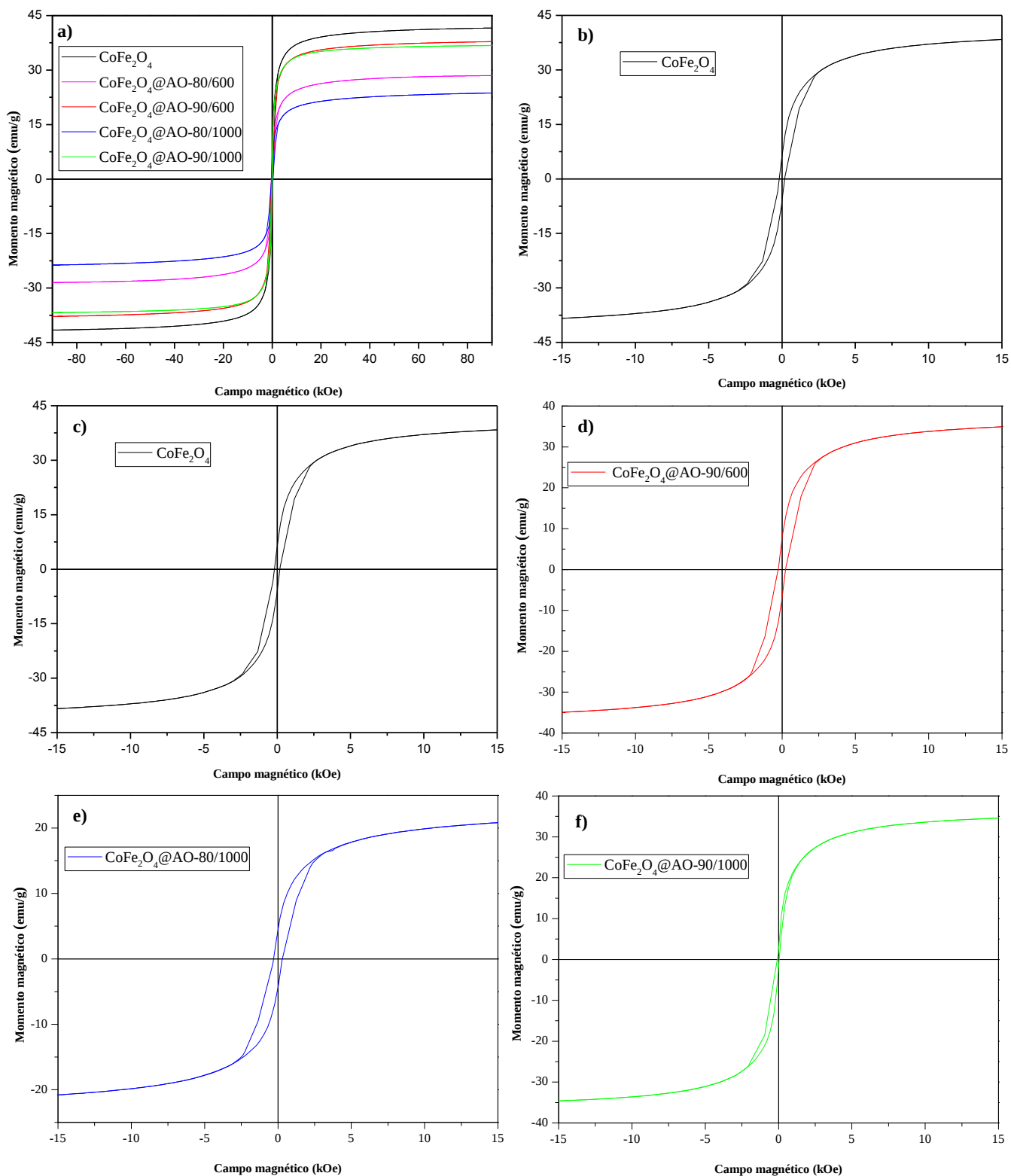


Figura 27: Curvas de magnetização dos produtos obtidos por coprecipitação, (a) Todas as amostras de CoFe_2O_4 (b) CoFe_2O_4 (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-80/600$ (d) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-90/600$ (e) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-80/1000$ (f) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-90/1000$.

Tabela 7: Propriedades magnéticas das NPsM de CoFe₂O₄ sintetizadas.

Amostras	Magnetização de saturação M _s (emu/g)	Magnetização remanente M _r (emu/g)	Coercividade H _c (Oe)	M _r /M _s	Temperatura de bloqueio T _B (K)
CoFe ₂ O ₄	41,54	6,02	194	0,145	343
CoFe ₂ O ₄ @AO-80/600	28,42	5,62	338	0,198	-
CoFe ₂ O ₄ @AO-90/600	38,27	7,51	243	0,196	-
CoFe ₂ O ₄ @AO-80/1000	23,65	5,09	301	0,215	356
CoFe ₂ O ₄ @AO-90/1000	36,73	2,26	62	0,061	294

Os resultados obtidos por Chia et al. (2010) mostraram valores de 53 Oe, 0,819 emu/g e 0,13 para H_c, M_r e M_r/M_s, respectivamente, muito semelhantes aqueles da amostra CoFe₂O₄@AO-90/1000. As amostras CoFe₂O₄@AO-90/600 e CoFe₂O₄@AO-90/1000 apresentaram maiores valores de M_s e menores H_c, tornando-se promissores para bioaplicações. Ao comparar todas as amostras de NPs, percebe-se que houve uma diminuição da M_s naquelas que incorporaram AO.

As amostras CoFe₂O₄@AO-80/600 e CoFe₂O₄@AO-80/1000 (síntese nas mesmas temperaturas e agitação mecânica de 600 rpm e 1000 rpm, respectivamente), apresentaram diferenças na M_s, M_r e H_c. A maior agitação parece ter contribuído para diminuir os valores. O mesmo ocorreu para as amostras CoFe₂O₄@AO-90/600 e CoFe₂O₄@AO-90/1000.

A literatura reporta que a coercividade e outras propriedades magnéticas possuem relação direta com o tamanho do cristalito das NPs de CoFe₂O₄, ou seja, menor o valor de coercividade menor é o diâmetro das NPs (GYERGYEKA *et al*, 2012). Isso foi observado para a amostra CoFe₂O₄@AO-80/1000 (H_c: 62 Oe, FWHM:0,71985), quando comparada com a ferrita de cobalto sem AO (H_c: 194 Oe e FWHM: 0,75064).

Para completar as medidas de magnetização, as amostras de CoFe₂O₄, CoFe₂O₄@AO-80/1000, CoFe₂O₄@AO-90/1000 (Figura 28), foram submetidas a medidas de magnetização em função da temperatura (M x T). Foram obtidas as curvas de Zero Field Cooling (ZFC) e Zero Cooling (FC) a um campo de 500 Oe, em um intervalo de temperatura de 5 K a 400 K. Essas curvas permitem a determinação da temperatura de bloqueio (T_B) de cada amostra, bem como ofereceram algumas informações importantes quanto às características nanoestruturais dos materiais.

Para a obtenção da curva ZFC, inicialmente a amostra é resfriada a um campo magnético nulo, após, é aplicado um campo magnético pequeno. A amostra é, então,

aquecida até certa temperatura, normalmente acima da T_B , e medida a sua magnetização. Já na curva FC, o campo magnético é aplicado e a amostra é resfriada até atingir uma temperatura baixa, após, a amostra é aquecida acima da T_B , e a magnetização é medida.

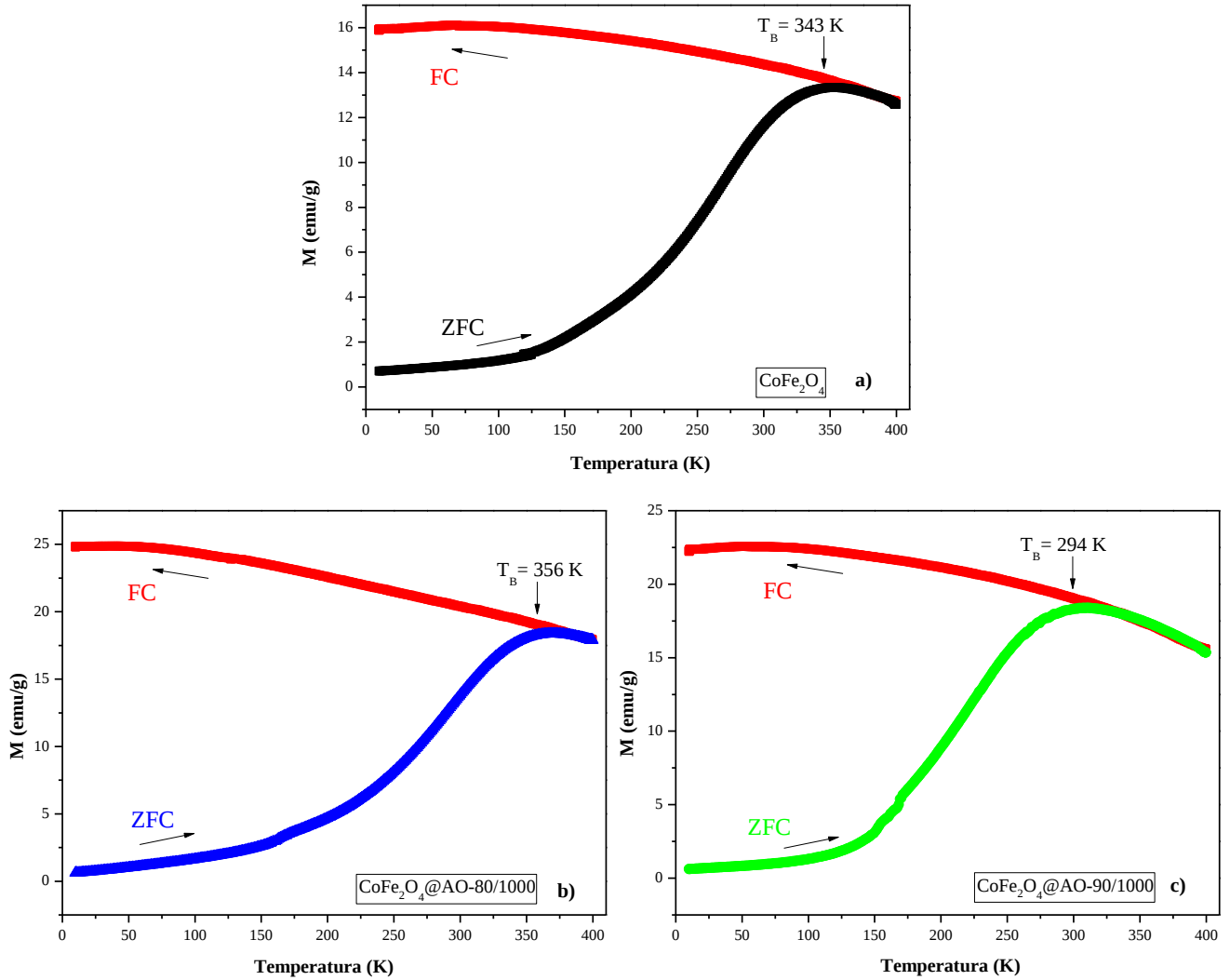


Figura 28: Curvas ZFC-FC das NPsM (a) CoFe_2O_4 (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-80/1000$ (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-90/1000$.

A T_B é obtida da curva ZFC (quando a curva ZFC se separa da curva FC) e caracteriza-se pela transição do estado bloqueado da amostra para o desbloqueado. Abaixo da T_B as NPsM comportam-se como monodomínios magnéticos, ou seja, ferromagnéticas, caracterizando comportamentos irreversíveis. O comportamento reversível (superparamagnético) apresenta coercividade e magnetização remanente acima da T_B . Essa T_B também está relacionada com o tamanho médio das partículas. Basicamente, quanto maior o valor de T_B , maior o tamanho médio das partículas.

Quando o valor de T_B é mais baixo que a temperatura ambiente o material assume comportamento superparamagnético (AJROUDI *et al*, 2014; GAUDISSON *et al*, 2014).

Diante de todas as análises realizadas e os resultados obtidos, a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ apresentou os resultados que mais se aproximam do comportamento superparamagnético, da mesma maneira que, apresentou o menor tamanho médio e a surfactação por AO.

5.2. Princípio Ativo Acetoxi DMU

O Ac.DMU foi obtido pela reação de Heck-Matsuda (PEREZ *et al*, 2014). Sua rota sintética apresenta eficiência, simplicidade e uma única etapa de reação. A Figura 29a apresenta o sal de diazônio, precursor para a obtenção do Ac.DMU, enquanto a Figura 29b apresenta o produto final obtido, o Ac.DMU.

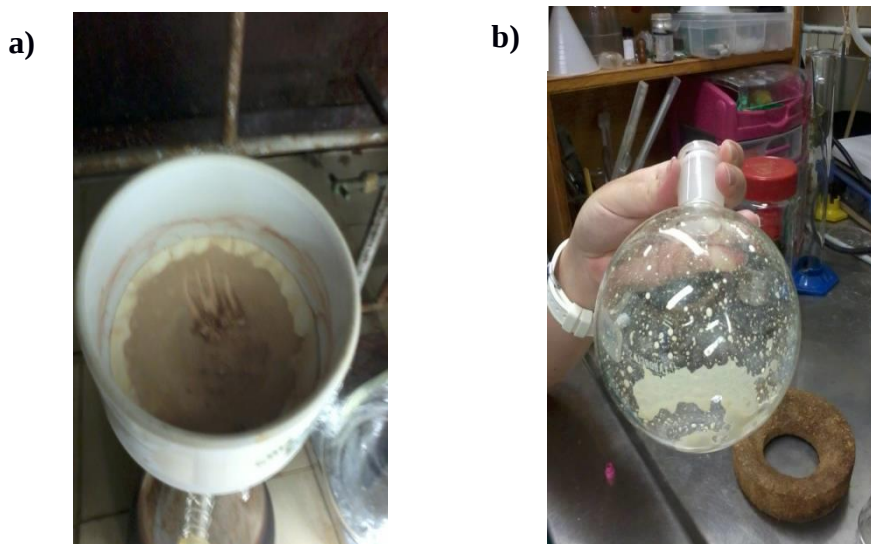


Figura 29: (a) Sal de diazônio e (b) Ac.DMU.

Para comprovar a obtenção da molécula de Ac.DMU, foram realizadas análises por RMN de ^1H (Figura 30). O espectro de RMN ^1H apresentou sinais próximos a δ_{H} 2,30, atribuídos aos hidrogênios ligados ao carbono do grupo acetoxi C-6, enquanto os sinais em torno de δ_{H} 3,87 são referentes aos hidrogênios ligados no carbono do grupo metoxi, C-5.

O sinal em δ_{H} 6,73 é devido aos hidrogênios ligados aos carbonos da insaturação presente na molécula. Próximo a δ_{H} 7,07 os sinais se referem aos hidrogênios presentes no anel aromático, próximos aos grupamentos metoxi, C-3. Em δ_{H} 7,10 os sinais são

referentes aos hidrogênios do outro anel aromático, situados próximos ao grupamento acetoxi, C-1, e em δ_H 7,52 são sinais atribuídos aos hidrogênios presentes no anel aromático, porém mais distantes do grupamento acetoxi, C-2. São valores concordantes com a literatura (MORO *et al*, 2008; MORO *et al*, 2010; PEREZ *et al*, 2014).

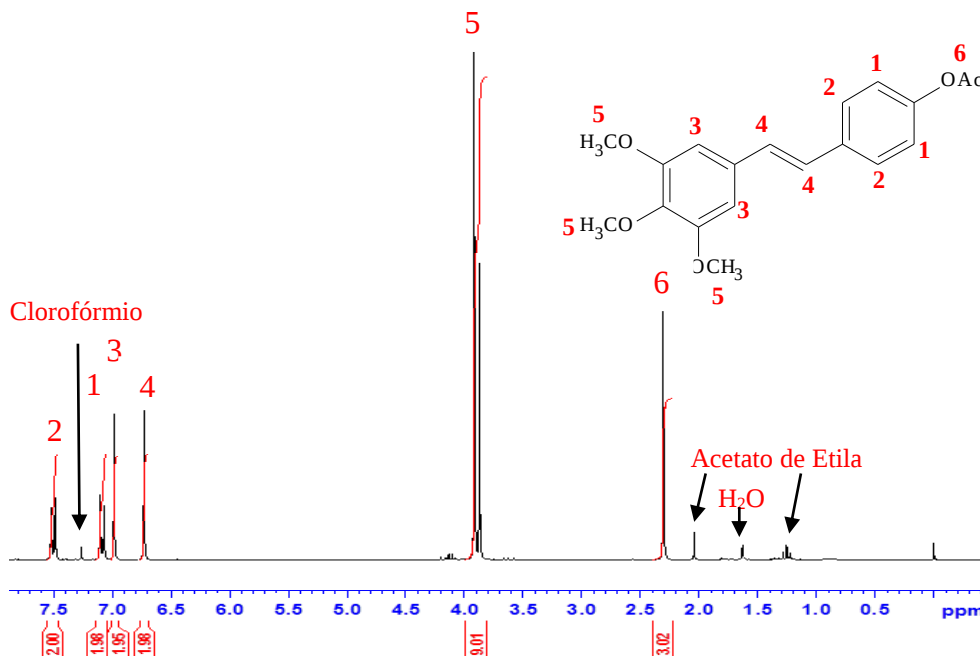


Figura 30: Espectros de RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$) do Ac.DMU.

Os sinais próximos a δ_H 1,2 e δ_H 2,1 são referentes aos hidrogênios do acetato de etila utilizado na rota sintética. Em δ_H 1,6 são sinais atribuídos a hidrogênios da água presente na molécula. O sinal em δ_H 7,2 são referentes aos hidrogênios do solvente utilizado para a análise do composto.

5.3. Quitosana, Carboximetilquitosana e Carboximetilquitosana-bz

A molécula da quitosana, 2-amino-2-dexoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose, provém da desacetilação da quitina que é obtida através de rejeitos de crustáceos tais como: camarões, caranguejos e lagostas (DASH *et al*, 2011; LORENZO *et al*, 2013). Esses rejeitos não possuem uma destinação correta e são depositados na natureza de forma a contribuir com a poluição. A utilização da quitosana é uma forma de minimizar a poluição do meio ambiente, bem como agregar valor a esses rejeitos. Um dos objetivos do trabalho foi a modificação superficial da molécula de quitosana para a obtenção de um polímero anfifílico.

Partindo da quitosana adquirida comercialmente, foi realizada a reação de carboximetilação para a inserção do grupo carboximetil (CH_2COO^-) na matriz polimérica, e a obtenção de um derivado hidrofílico (CMQT) (LONG *et al*, 2013), solúvel em solventes polares. Em seguida houve a reação com o benzaldeído para a obtenção de um derivado com partes hidrofóbicas (RABEA *et al*, 2005), com a inserção de anel aromático aos grupamentos NH_2 .

Na reação de carboximetilação, representada na Figura 32, previamente a quitosana reagiu com hidróxido de sódio para o rompimento da sua estrutura rígida, tornando-se um nucleófilo. A reação prosseguiu com a adição de ácido monocloraacético. A molécula de quitosana atacou o carbono ligado ao cloro do ácido monocloraacético e expulsando o grupo de saída (Cl^-), ou seja, uma reação de substituição nucleofílica bimolecular $\text{S}_\text{N}2$, originando a molécula de CMQT. Essa reação ocorreu em temperaturas consideravelmente baixas, aproximadamente -5°C , para que ocorresse a $\text{S}_\text{N}2$ na hidroxila da quitosana. Consequentemente o grupo amina permaneceria livre para posteriores reações com o benzaldeído e formação do CMQT-BZ.

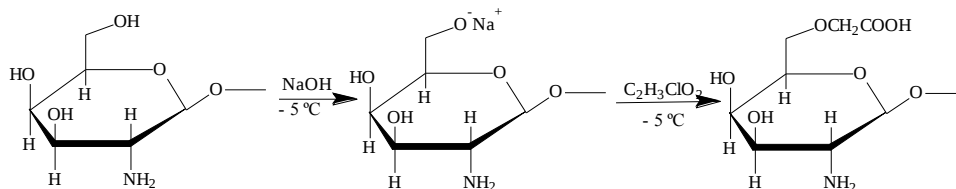


Figura 31: Reação para obtenção do CMQT. Fonte: UPADHYAYA *et al* (2013)

Para a obtenção do CMQT-BZ (Figura 32), foi utilizada a molécula de CMQT da reação anterior e realizada uma reação com o benzaldeído.

O grupo amino presente na CMQT é bastante reativo. Ele realizou um ataque nucleofílico na carbonila do benzaldeído, removendo a água e formando uma base de Schiff (formação da imina). Após 24 horas de reação o borohidreto de sódio, que atua como um agente redutor, foi adicionado ao sistema. Esse processo é denominado aminação redutiva.

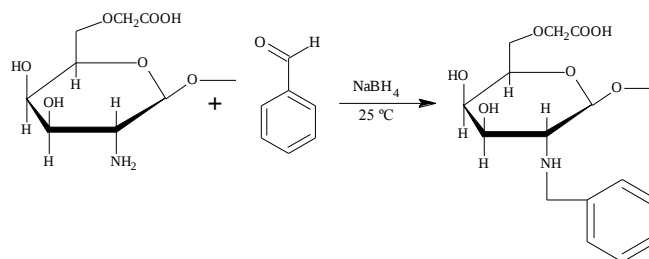


Figura 32: Reação para obtenção do CMQT-BZ. Fonte: RABEA et al (2005)

A caracterização da quitosana modificada foi realizada através das titulações condutimétricas e potenciométricas. Através da condutimetria foi possível obter o grau de carboximetilação (GC) da molécula modificada.

Na condutimetria as diferentes amostras foram dispersas em meio aquoso e solubilizadas em ácido clorídrico (HCl) 0,02 mol L⁻¹. Através dos gráficos de condutividade versus volume de NaOH, foram observados os pontos de inflexão e calculado o grau de carboximetilação dos produtos obtidos.

Nas curvas de titulação condutimétrica (Figura 33) são observados dois pontos de inflexão: o primeiro ponto de inflexão (volume 1) pode ser atribuído ao fim da titulação do excesso do ácido forte (HCl); e o segundo ponto de inflexão (volume 2) pode ser atribuído a neutralização dos grupos CH₂COO⁻. A partir do segundo ponto de inflexão (V₂) o aumento da condutividade é mais acentuado, pois houve a adição de excesso de base, consequentemente o aumento da concentração de íons hidroxila em solução (ABREU e CAMPANA, 2009; BIDGOLI *et al*, 2010).

A amostra que apresentou melhor grau de substituição foi a amostra CMQT 1,5 M (Tabela 8). Conforme descrito na literatura, essa amostra poderá apresentar melhor solubilidade em água (LONG *et al*, 2013).

A explicação para a maior carboximetilação da CMQT 1,5 M, e valores baixos para as demais (Tabela 8), pode estar relacionado a erros experimentais na síntese orgânica. Entretanto, esses valores baixos estão próximos aqueles relatados na literatura. Por exemplo, Bidgoli et al (2010) variaram a quantidade de NaOH e ácido monocloraacético em cada síntese e obtiveram valores entre 24% a 96%, no entanto, eles observaram que ao aumentar a quantidade de ácido monocloraacético aumentava o grau de carboximetilação, fenômeno não observado nos experimentos deste trabalho. Isso pode ser justificado pela sensibilidade da rota sintética, a qual envolveu temperaturas abaixo de 0 °C, se tornando difícil o seu controle. O grau de carboximetilação foi obtido através da Equação 6.

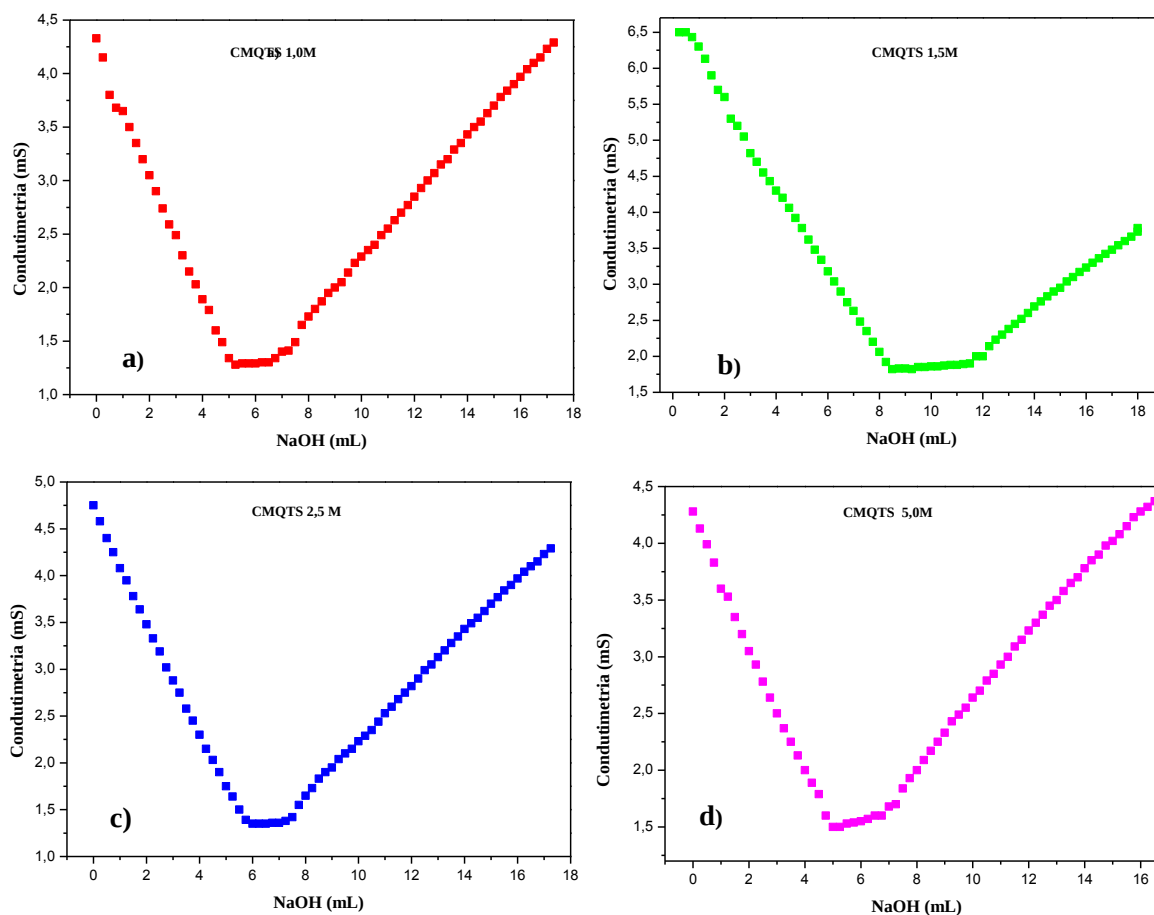


Figura 33: Condutimetria versus volume de NaOH, (a) CMQT 1,0M, (b) CMQT 1,5M, (c) CMQT 2,5M, (d) CMQT 5,0M.

Tabela 8: Volumes no ponto de inflexão e grau de carboximetilação das amostras de CMQT.

Amostras	V ₁ e V ₂	% GC
CMQT 1,0 M	4,9 mL e 7,3 mL	27,8 %
CMQT 1,5 M	8,4 mL e 12,2 mL	44,1 %
CMQT 2,5 M	5,6 mL e 7,5 mL	22,1 %
CMQT 5,0 M	4,7 mL e 7,3 mL	30,1 %

A titulação potenciométrica foi utilizada para determinar o grau de acetilação (GA), ou seja, a quantidade de grupo acetamido livres na molécula de quitosana e o grau de desacetilação (GD) que é a quantidade de grupos amino livres na molécula de quitosana e nas moléculas após a reação de modificação com a inserção do grupo carboximetil.

Após a titulação, foram obtidos os gráficos de pH versus volume de NaOH, bem como o gráfico da primeira derivada do pH versus volume de NaOH (Figura 34). Como

pode ser observado o gráfico da Figura 34b apresentou comportamento diferente dos demais, com três inflexões. As inflexões presentes nos gráficos podem ser atribuídas inicialmente a neutralização de HCl e por fim, a neutralização dos grupos amino protonados (NH_3^+) presentes em solução.

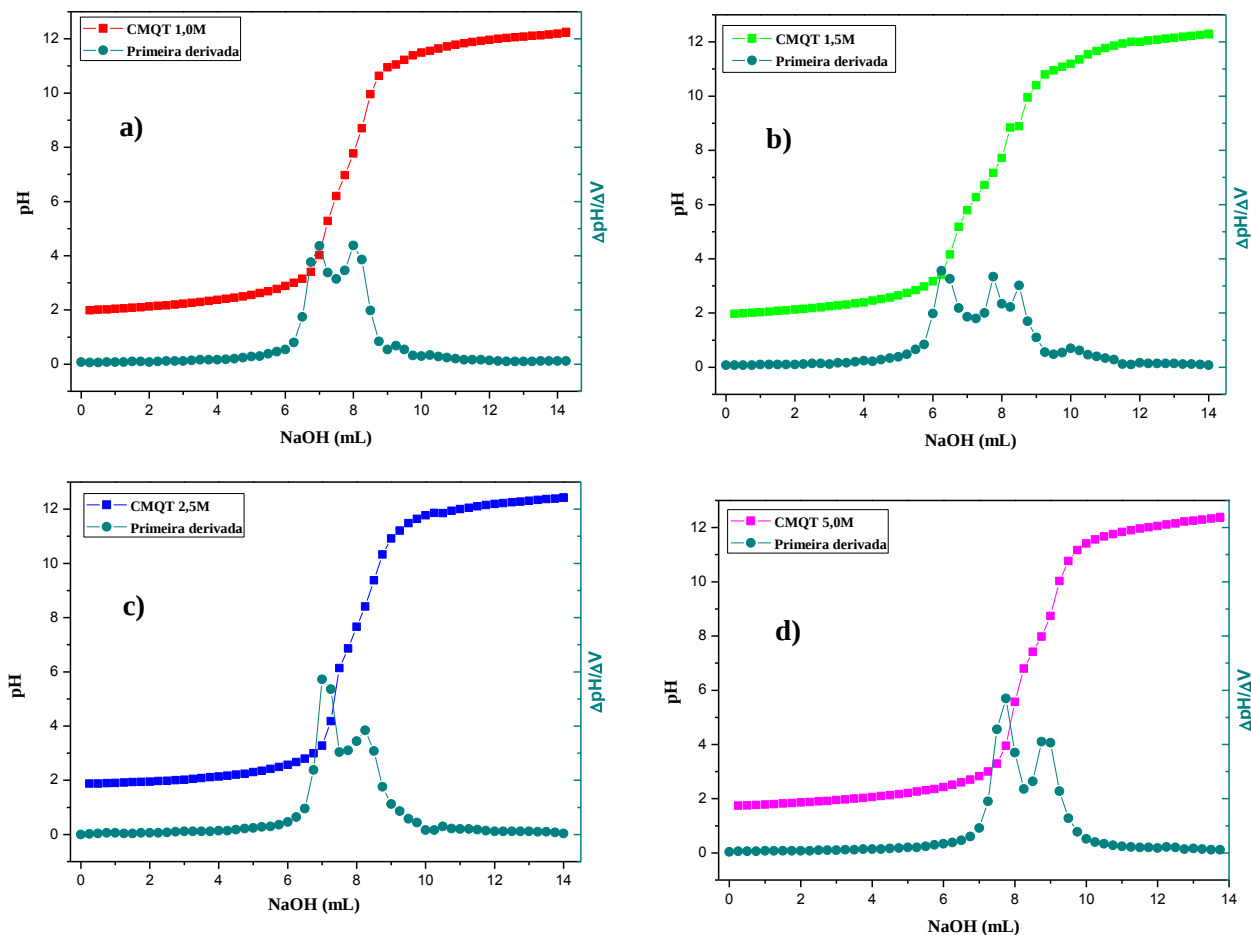


Figura 34: pH versus volume de NaOH e primeira derivada de pH versus volume de NaOH (a) CMQT 1,0M (b) CMQT 1,5M (c) CMQT 2,5M (d) CMQT 5,0M.

As porcentagens de GD e GA foram obtidas através da Equação 7 e Equação 8, respectivamente, e estão expostas na Tabela 9.

A quitosana apresentou GD de 83,7% e está dentro do reportado na embalagem, ou seja, GD entre 75 e 85%. A amostra CMQT 1,5 M apresentou a maior porcentagem de grupos amino livres, indicando que a reação de carboximetilação ocorreu a maior parte na hidroxila da molécula. As outras amostras apresentaram graus de desacetilação menores, esse fato pode ser explicado pela inserção do grupo carboximetil não apenas nas hidroxilas, mas também nos grupos NH_2 da quitosana, tal fato é possível de ser observado no RMN de ^1H que apresenta sinais de baixa intensidade da inserção do

grupo carboximetil nos grupos NH_2 . Portanto, as amostras CMQT 1,5M foi escolhida para a continuação dos experimentos e obtenção do CMQT-BZ.

Tabela 9: Volumes do ponto de inflexão e percentagens de GD e GA das amostras de quitosana e CMQT.

Amostras	V ₁ e V ₂	% GD (NH_2 livre)	% GA
Quitosana	6,2 mL e 8,8 mL	83,7	16,3
CMQT 1,0 M	6,6 mL e 8,9 mL	74,1	-
CMQT 1,5 M	6,1 mL, 7,7 mL e 8,6 mL	80,1	-
CMQT 2,5 M	6,7 mL e 8,9 mL	70,8	-
CMQT 5,0 M	7,3 mL e 9,7 mL	77,2	-

A caracterização por espectroscopia de RMN ^1H permitiu verificar a carboximetilação e a inserção do benzaldeído na matriz polimérica. Entretanto, a espectroscopia de RMN ^1H , bem como a espectroscopia na região do infravermelho, apresentaram algumas limitações na identificação devido aos picos sobrepostos e a complexidade da molécula modificada. A carboximetilação nem sempre é completa e algumas hidroxilas continuam livres. Além disso, ainda há grupo acetamido da quitina na molécula de partida (quitosana) devido ao processo de desacetilação parcial (DASH e CUDWORTH II, 1998; CHEN e PARK, 2003; JIN *et al*, 2012; UPADHYAYA *et al*, 2013).

No espectro de RMN ^1H da amostra de quitosana (Figura 35a) foi possível observar sinais δ_{H} 1,01 atribuídos a hidrogênios do grupo acetamido dos monômeros residuais da quitina. Em aproximadamente δ_{H} 1,9 o sinal corresponde aos hidrogênios metílicos presentes no grupo acetamido; os sinais presentes em δ_{H} 3,1 são atribuídos ao hidrogênio ligado ao carbono C-2, e os sinais próximos a δ_{H} 3,4 e δ_{H} 3,8 referem-se aos hidrogênios ligados aos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel glicopirranose. O sinal intenso que aparece entre δ_{H} 4,4 e 4,9 é característico do hidrogênio da água deuterada (D_2O) utilizada como solvente e este sinal sobrepõe ao sinal do hidrogênio ligado ao carbono C-1, que pode ser encontrado entre δ_{H} 4,5 e 4,8 (LIU *et al*, 2010; JIN *et al*, 2012).

Os espectros de RMN ^1H das amostras carboximetiladas (Figuras 35b, 35c, 35d e 35e) apresentam características semelhantes e diferem da amostra da quitosana.

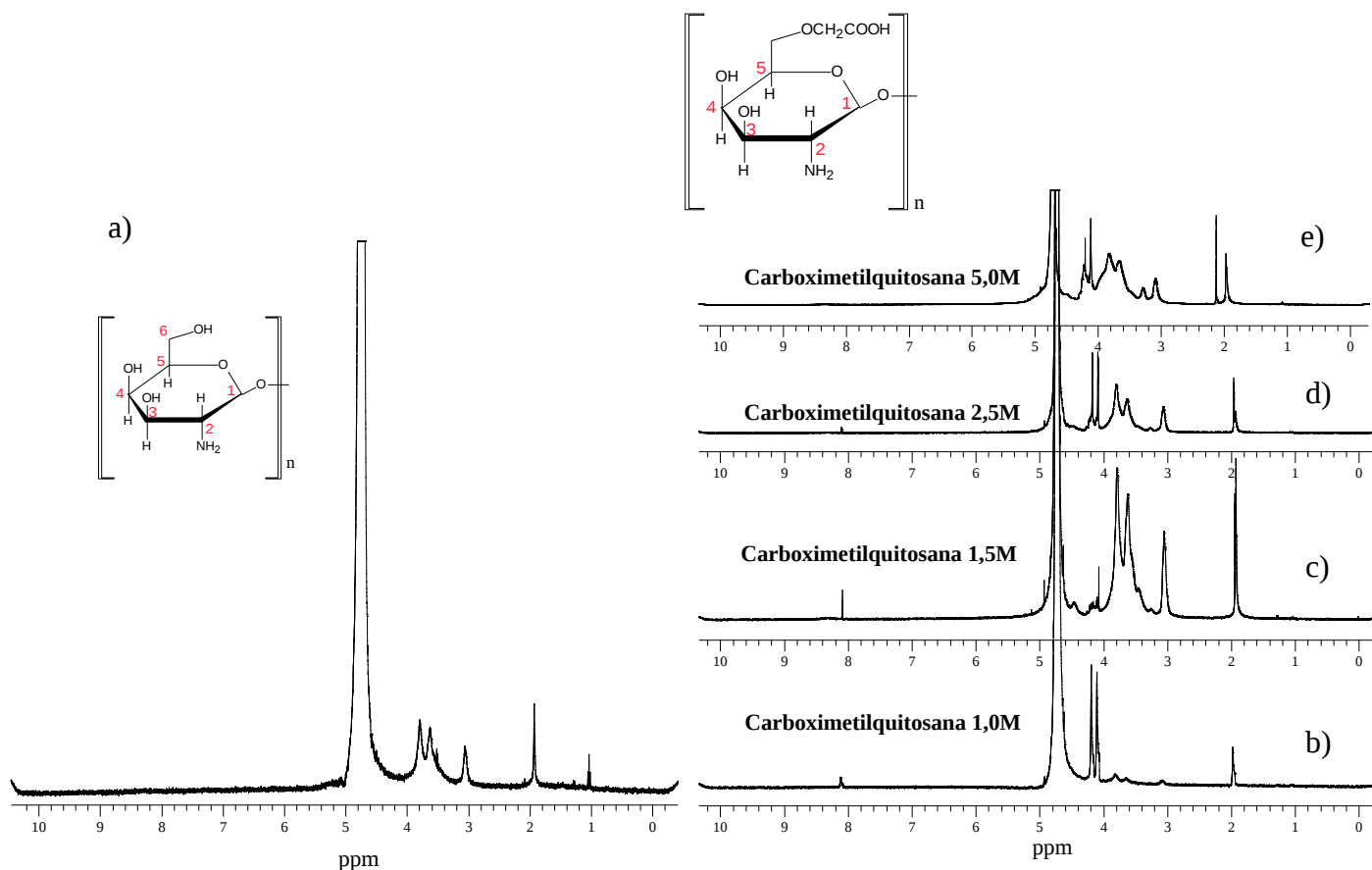


Figura 35: Espectros de RMN ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$) das amostras de (a) quitosana, (b) CMQT 1,0M, (c) CMQT 1,5M, (d) CMQT 2,5M e (e) CMQT 5,0M.

O sinal em torno de δ_{H} 2,0 é correspondente a hidrogênios metílicos do grupo acetamido, enquanto que o sinal em δ_{H} 3,1 pode ser relativo ao hidrogênio ligado ao carbono C-2 do grupo glucosamina. Em δ_{H} 3,4 foram observados sinais que evidenciam a mono e dissustituição do grupamento amino, porém, como são sinais de baixa intensidade, pode-se afirmar que a carboximetilação em grupamentos amino ocorreu em pequena quantidade. Os sinais presentes entre δ_{H} 3,6 e 4,0 indicam os hidrogênios ligados aos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel da glucosamina. A região de δ_{H} 4,05 a 4,55 corresponde aos hidrogênios do grupo carboximetil, substituídos nos carbonos C-3 e C-6. O sinal presente entre δ_{H} 4,6 a 5,1 corresponde aos hidrogênios da água deuterada (D_2O). Esse sinal intenso se sobrepõe ao sinal do hidrogênio ligado ao carbono C-1 (LIU *et al*, 2010; JIN *et al*, 2012).

Para as amostras de CMQT-BZ (Figura 36a, 36b e 36c), os sinais existentes entre δ_{H} 1,9 e 2,1 referem-se aos hidrogênios do grupamento acetamido (CH_3) dos monômeros residuais da quitina. Em torno de δ_{H} 3,1 o sinal é atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C-2 do anel glucosamina. Os sinais entre δ_{H} 3,4 e 4,1 são relativos

aos hidrogênios ligados aos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-6. As regiões de δ_H 4,05 a 4,55 correspondem a hidrogênios do grupo carboximetil, substituídos nos carbonos C-3 e C-6. O sinal presente em torno de δ_H 7,4 é devido aos hidrogênios do anel aromático (RABEA *et al*, 2005; DEBRASSI *et al*, 2012). Desta forma, foi possível afirmar que houve a inserção de novos grupos na molécula de quitosana.

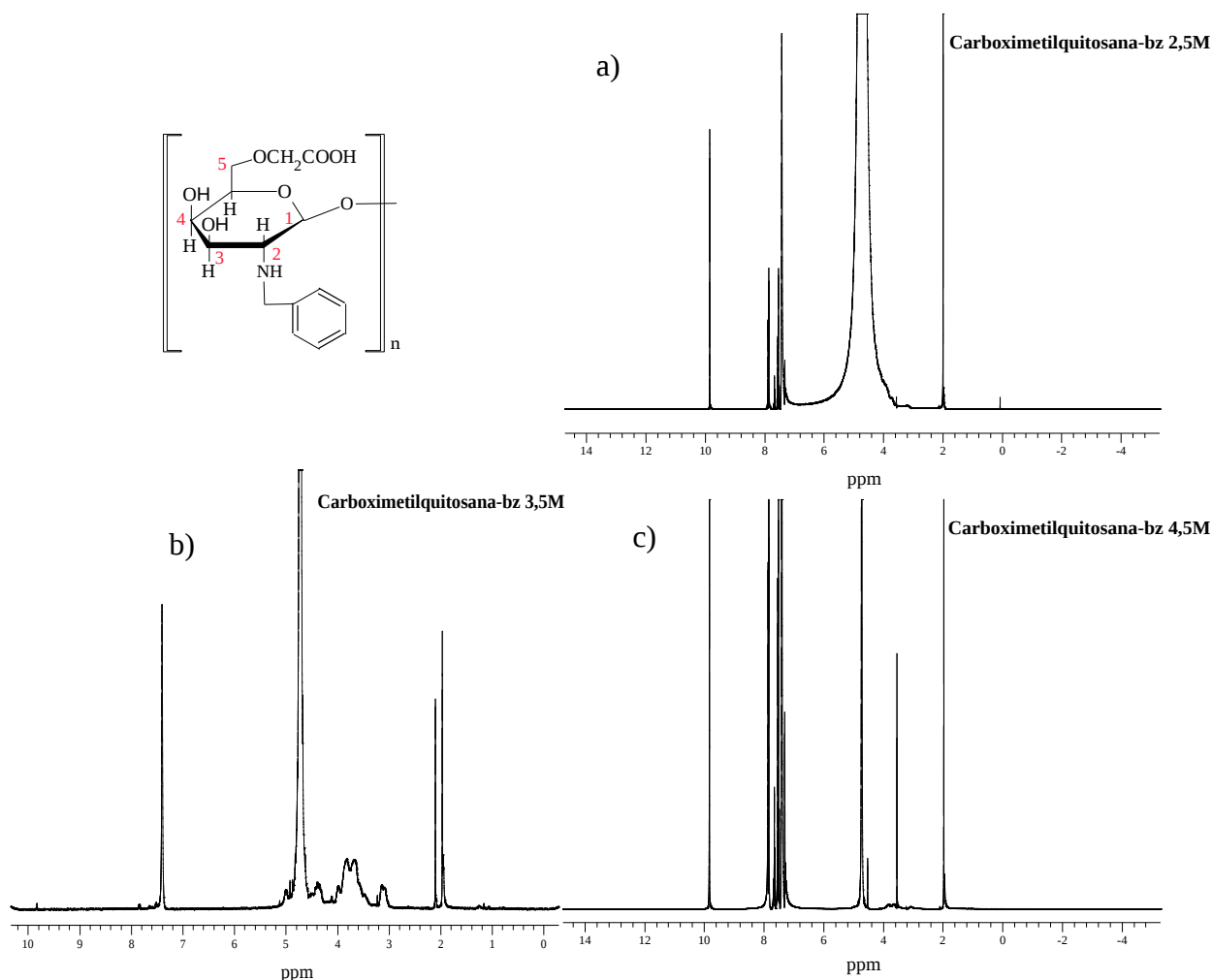


Figura 36: Espectros de RMN ¹H (400 MHz, D₂O/HCl) das amostras (a) CMQT-BZ 2,5M, (b) CMQT-BZ 3,5M, (c) CMQT-BZ 4,5M.

O grau de substituição (GS) nas amostras CMQT-BZ foi calculado pela Equação 9, através da espectroscopia de RMN ¹H e utilizando a área das integrais nas regiões de aproximadamente δ_H 7,5 (aromáticos) e δ_H 3,1 (C-2). Foram obtidos valores de 40%, 50% e 66%, para CMQT-BZ 2,5M, CMQT-BZ 3,5M e CMQT-BZ 4,5M, respectivamente. Guo *et al*. (2006) obtiveram GS de 60%, enquanto Debrassi *et al*. (2012) obtiveram GS de 19%. Desta maneira, os valores obtidos nesse trabalho estão dentro do esperado. A amostra escolhida para a produção das nanoesferas foi a CMQT-BZ 3,5M.

Análises de FTIR foram realizadas para confirmar se houve a inserção dos novos grupos funcionais nas amostras de CMQT-BZ.

A Figura 37 apresenta espectros na região do infravermelho das amostras de quitosana, das quatro amostras de CMQT e da CMQT-BZ 3,5M. As bandas vibracionais correspondentes as diferentes amostras encontram-se sumarizadas na Tabela 18 (Anexo 2).

O espectro de infravermelho da quitosana (Figura 37a) apresentou bandas características de alta intensidade e largura na região de 3310 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento O–H das hidroxilas da estrutura. Também pode estar associada à presença de umidade na molécula, assim como a banda de estiramento N–H das unidades acetiladas presente na cadeia polimérica, superposta pela banda de O–H. Em 2890 cm^{-1} encontram-se bandas características de estiramento simétrico e assimétrico –C–H. A região próximo a 1658 cm^{-1} refere-se ao estiramento C=O do grupo acetamida (amida I) devido a desacetilação incompleta da quitina. Em 1586 cm^{-1} refere-se à flexão do N–H (amida II). As bandas presentes em 1434 cm^{-1} e 1386 cm^{-1} são conferidas ao estiramento de CH_2 e CH_3 , respectivamente, enquanto em 1151 cm^{-1} e 870 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento das ligações beta glicosídicas entre os carbonos 1 e 4. Em 1021 cm^{-1} é possível observar uma banda intensa referente ao estiramento C–O–C do anel glicopironosídeo (CHEN e PARK 2003; GE e LUO, 2005; JIN *et al*, 2012).

Após a reação de carboximetilação da quitosana, ocorreram alterações nos espectros de infravermelho e algumas similaridades, (Figura 37b, 37c, 37d, 37e). As bandas presentes em 3350 cm^{-1} são caracterizadas como estiramentos O–H. Os espectros das diferentes amostras também apresentaram a banda em torno de 2900 cm^{-1} , com exceção da amostra carboximetilquitosana 1,0 M, possivelmente devido a sobreposição pela banda de O–H. Essas bandas são características do estiramento –C–H. As amostras CMQT 1,5M (Figura 37c) e CMQT5,0M (Figura 37e), apresentaram bandas nas regiões de 2368 cm^{-1} , possivelmente da molécula de CO_2 .

A amostra CMQT1,5M (Figura 37c) apresentou uma banda na região 1658 cm^{-1} , referente ao estiramento C=O do grupo acetamido (amida I) devido à desacetilação incompleta da quitina. As bandas presentes nas regiões de 1600 cm^{-1} e 1412 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento C–O, do grupamento carboximetil introduzidos na reação de carboximetilação, indicando que a carboximetilação foi bem-sucedida. Em 1311 cm^{-1} encontra-se bandas de estiramento C–N da amida. A banda presente na região de 1065

cm^{-1} , é devido a deformação angular de $-\text{C}-\text{O}$ (CHEN e PARK 2003; GE e LUO, 2005; JIN *et al*, 2012).

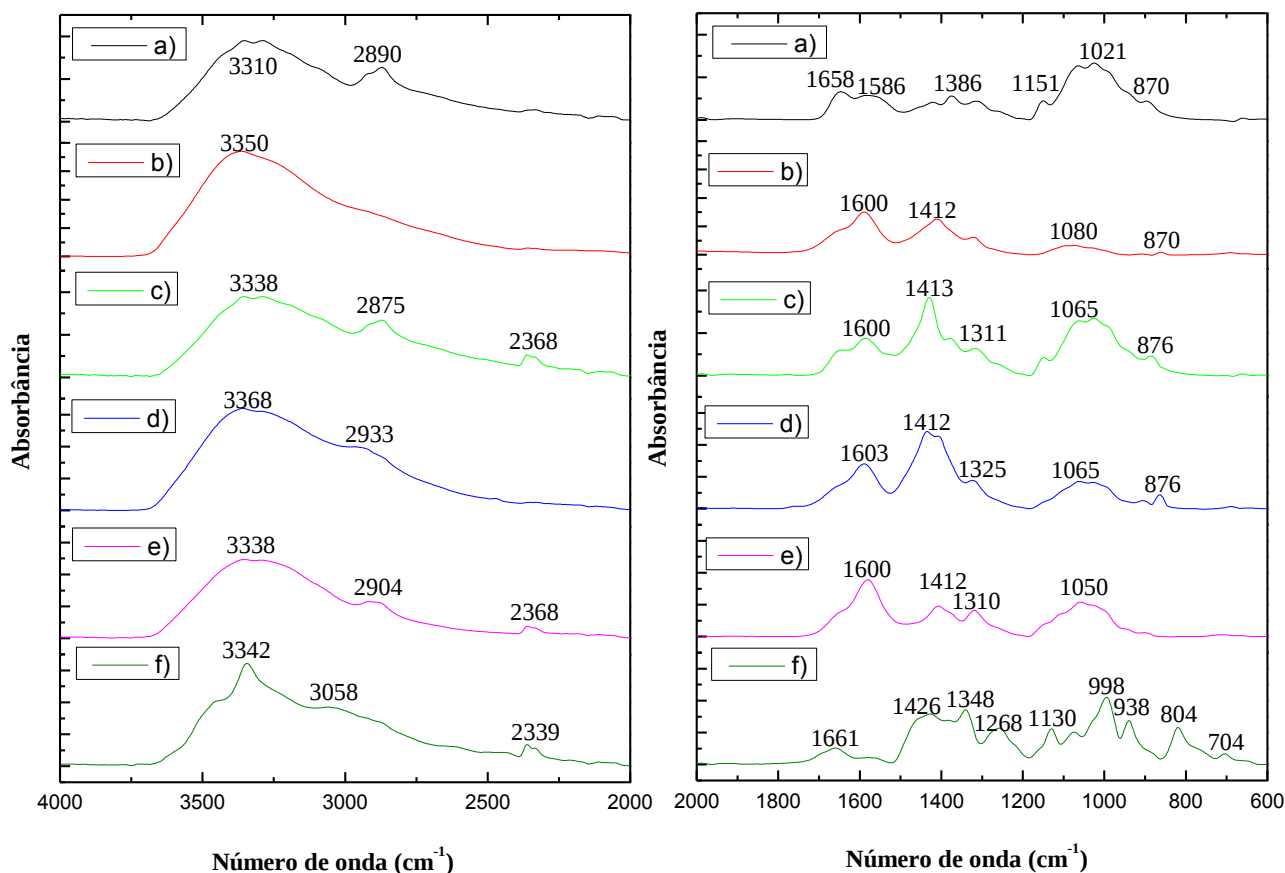


Figura 37: Espectros na região do infravermelho das amostras de (a) quitosana (b) CMQT 1M (c) CMQT 1,5M (d) CMQT 2,5M (e) CMQT 5M (f) CMQT-BZ 3,5M.

Após a carboximetilação, foi obtida a CMQT-BZ 3,5M. O espectro na região do infravermelho para essa amostra (Figura 37f) apresentou algumas diferenças em relação a quitosana de partida e das amostras de CMQT. Uma banda intensa na região de 3352 cm^{-1} indicando a presença do grupamento $\text{O}-\text{H}$ ou a sobreposição do $\text{N}-\text{H}$ pelo $\text{O}-\text{H}$. A banda referente ao estiramento do $-\text{C}-\text{H}$ aparece um pouco deslocada, em torno de 3058 cm^{-1} . As bandas em 1661 cm^{-1} são atribuídas a carboníla do grupo acetamida-amida I. E as bandas intensas em torno de 1426 cm^{-1} , 1348 cm^{-1} , 998 cm^{-1} , indicam a inserção do anel aromático na estrutura do CMQT 1,5M. A presença de bandas nas regiões de 1130 cm^{-1} e 804 cm^{-1} , podem ser atribuídas ao estiramento das ligações beta glicosídicas entre os carbonos 1 e 4 (GUO *et al*, 2006; DEBRASSI *et al*, 2012).

Após a confirmação por FTIR da inserção dos novos grupos na matriz polimérica da quitosana foi realizado a caracterização através das técnicas de TG/DTA e

DSC, as quais analisam a estabilidade térmica das amostras e avaliam a perda de massa dos grupos orgânicos ligados através de reações de modificação. Foram realizadas as análises da amostra de quitosana (Figura 38a), CMQT 1,5 M (Figura 38b) e CMQT-BZ 3,5 M (Figura 38c).

Conforme observado na Figura 39a às curvas TG/DTA da quitosana apresentaram um processo de desidratação (27 °C a 150 °C), com 9% de perda de massa. Essa perda também pode estar associada a perda de água ligada por ligações de hidrogênio com grupos hidroxilas da quitosana ou estar sorvida fisicamente na superfície da quitosana. Ocorreu, também, um processo de decomposição do polímero (210 °C a 404 °C), com perda de 47% de massa, mais especificamente das unidades acetiladas/desacetiladas. A curva de DSC comprova o observado na curva de TG, apresentando dois eventos térmicos. O primeiro evento, um pico endotérmico, com temperatura de pico a 65 °C, sugerindo um processo de desidratação, e outro pico, agora exotérmico, T_{onset} de 274 °C. O pico a 304 °C é devido a decomposição da matriz polimérica, degradação do polissacarídeo (JIAO *et al*, 2011; MULLER *et al*, 2011).

O termograma da CMQT (Figura 38b) apresentou uma perda de massa de 12,2%, entre 25 °C e 140 °C, referente a desidratação da amostra. Esse processo pode ser comparando com a quitosana, a qual possui perda de massa menor, de 9%, o que é explicado pela menor absorção de água que a quitosana. As moléculas de CMQT são mais hidrofílicas devido ao grupo carboximetil, apresentando uma melhor acessibilidade das moléculas de água a seus sítios (ABREU e CAMPANA, 2009). O evento endotérmico presente no DSC com temperatura de pico em 50 °C confirmou a desidratação da molécula. Entre 170 °C e 209 °C é possível observar nas curvas TG/DTA uma perda de massa de 6,8%, que pode ser atribuída aos grupos orgânicos, evento confirmado pelo DSC com um pico exotérmico em 191 °C. Já a perda de massa acentuada de 30,6% entre as temperaturas de 212 °C e 350 °C demonstram a degradação térmica do biopolímero, observado também no DSC, pico exotérmico com temperatura de pico de 267 °C. A perda de massa de 14,7% entre 540 °C e 790 °C está relacionada com a decomposição do biopolímero (KITTUR *et al*, 2002; MIRANDA *et al*, 2006).

O termograma da amostra CMQT-BZ 3,5M pode ser observado na Figura 38c, com perda de massa de 2,8% atribuída à evaporação de alguns compostos voláteis entre 19 °C e 68 °C. O termograma mostra 2,7% de perda de massa entre 70 °C e 102 °C, relativo a perda de água presente na molécula, com evento endotérmico no DSC, T_p de 92 °C. Entre 105 °C e 180 °C aparece um pico bem intenso, com perda de massa de

12,6%, atribuído a degradação do anel aromático inserido na molécula. No DSC esse evento é confirmado com um pico endotérmico em 140 °C. Entre 201 °C e 380 °C, com perda de massa de 23,8%, é devido a decomposição polimérica, com pico exotérmico em T_p de 284 °C, no DSC, confirmando a decomposição do polímero. O quinto processo entre 530 °C e 753 °C, com perda de massa de 10,2%, está associado a decomposição da matéria orgânica polimérica, confirmado pelo DSC com um pico exotérmico em T_p de 574 °C (KITTUR *et al*, 2002; MIRANDA *et al*, 2006; DEBRASSI *et al*, 2012).

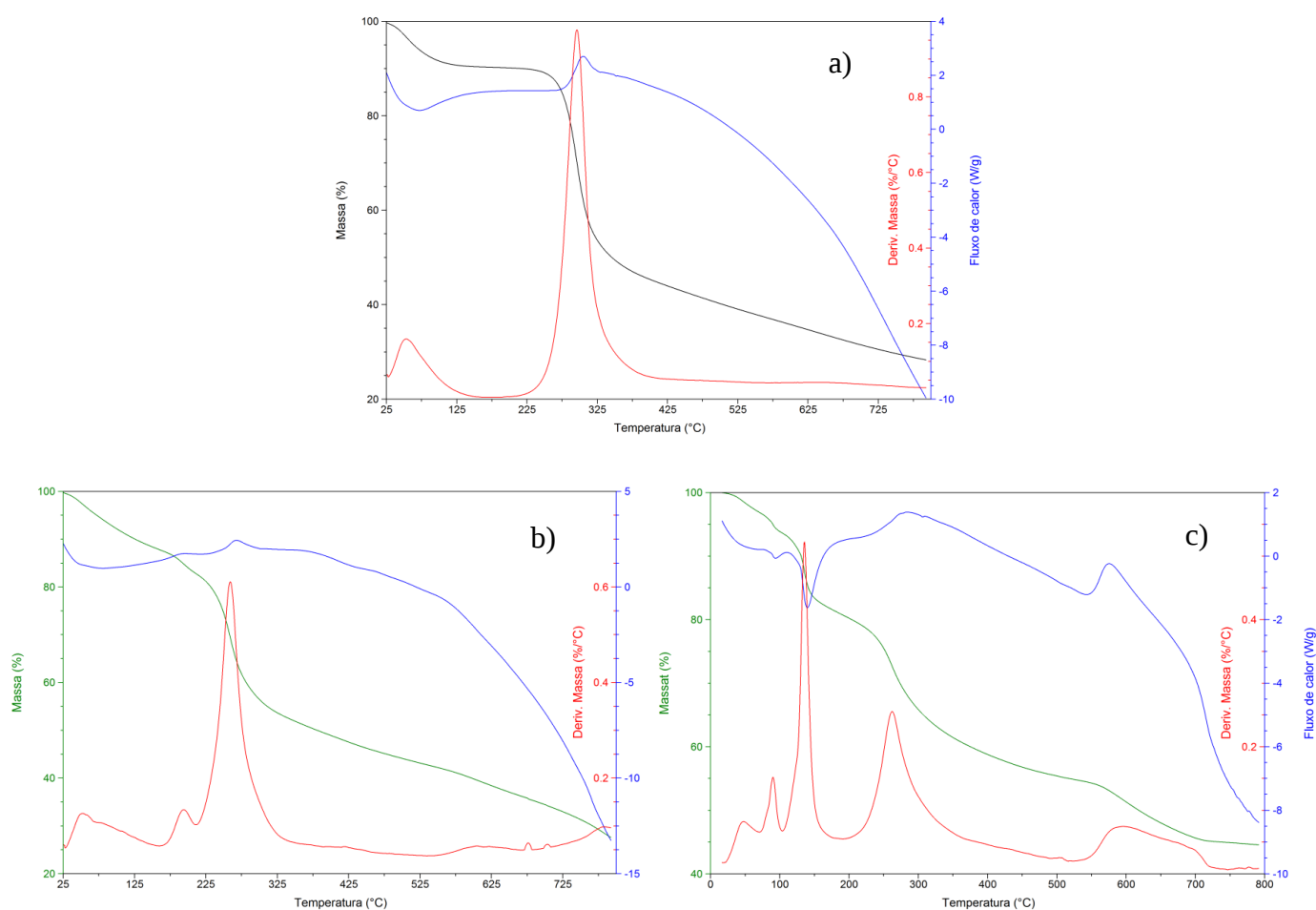


Figura 38: Curvas de TG/DTA e DSC das amostras de (a) quitosana (b) CMQT 1,5M e (c) CMQT-BZ 3,5M.

Após todas as sínteses realizadas e obtenção dos materiais, foi possível desenvolver a produção das nanoesferas poliméricas magnéticas e das nanoesferas poliméricas, os materiais selecionados foram:

- NPsM: amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO-90/1000$;
- Princípio ativo: Ac.DMU;

- Polímero: CMQT 1,5M e CMQT_BZ 3,5M;
- Método de obtenção das nanoesferas: emulsão difusão do solvente;

5.4. Nanoesferas Poliméricas Magnéticas e Nanoesferas Poliméricas

As nanoesferas poliméricas magnéticas e as nanoesferas poliméricas contendo o fármaco foram obtidas pelo método de emulsão difusão do solvente. Em cada experimento foram mantidas constantes a quantidade em massa dos polímeros (CMQT 1,5M ou CMQT-BZ 3,5M) e a quantidade em massa de NPsM (quando utilizada), e variado a quantidade em massa do fármaco (1%, 3% e 6% da massa do fármaco em relação a massa do polímero utilizada).

O diâmetro médio dos coloides foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Essa técnica também possibilita obter os índices de polidispersão (IPd) das amostras. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 10.

Os menores diâmetros obtidos foram das amostras sem a presença de NPsM na síntese. Para a amostra utilizando o polímero CMQT 1,5M os tamanhos variaram de 133,8 nm a 198,0 nm conforme ocorreu o aumento da quantidade em massa do fármaco adicionada (1% a 6%).

Resultados parecidos foram observados para as amostras utilizando o polímero CMQT-BZ para 1% e 3% de fármaco, quando usado 1% do fármaco o diâmetro obtido foi de 235,6 nm e ao usar 3% do fármaco o tamanho analisado foi de 319,7 nm, no entanto, para o teor de 6% do fármaco o diâmetro encontrado foi de 115,2 nm, essa diferença pode estar associada a algum tipo de erro durante a síntese da nanoesfera, o valor do IPd dessa amostra foi 1, indicando amostras com tamanhos bem discrepantes. A literatura reporta (FRESTA *et al*, 1995; UNSOY *et al*, 2014) que a quantidade de fármaco pode influenciar o diâmetro das NPs obtidas, ou seja, maior a quantidade de fármaco adicionada maior o tamanho das partículas, no entanto, este fato não é uma regra, o diâmetro também depende da quantidade em massa do polímero utilizado e do método de obtenção dos coloides.

Tabela 10: Diâmetros das nanoesferas poliméricas magnéticas e nanoesferas poliméricas determinados por DLS.

Polímeros						
x	1%		3%		6%	
% de Acetoxi DMU	Dz(nm)	IPd	Dz(nm)	IPd	Dz(nm)	IPd
CMQT 1,5M						
+	401,8	0,647	331,9	0,587	367,6	0,506
CoFe₂O₄@AO-90/1000						
CMQT 1,5M	133,8	0,404	173,7	0,757	198,0	0,562
CMQT-BZ 3,5						
+	482,5	0,223	422,2	0,372	459,1	0,454
CoFe₂O₄@AO-90/1000						
CMQT-BZ 3,5M	235,6	0,500	319,7	0,165	115,2	1

*1%, 3%, 6% da quantidade em massa do fármaco em relação a massa do polímero.

*Nanoesferas poliméricas (Polímero + fármaco): CMQT ou CMQT-BZ.

*Nanoesferas poliméricas magnéticas (Polímero + NPsM + fármaco): CMQT + CoFe₂O₄@AO-90/1000 e CMQT-BZ + CoFe₂O₄@AO-90/1000.

Para aplicações na liberação controlada e/ou direcionada de fármacos via endovenosa com sistemas de NPs poliméricas os tamanhos indicados são próximos a 300 nm (HANS *et al*, 2002; AMIRI *et al*, 2013). Portanto, os diâmetros médios das partículas obtidas estão dentro ou próximos do que é reportado na literatura.

Não há relatos na literatura sobre sistemas de NPs poliméricas utilizando o fármaco Ac.DMU, porém, é possível encontrar estudos que utilizaram alguns derivados da quitosana, também o resveratrol, e sistemas nanoestruturados contendo partículas de CoFe₂O₄.

Anitha *et al* (2012) produziram partículas de curcumina revestidas com carboximetilquitosana e obtiveram nanoesferas com tamanhos entre 100 e 180 nm (DLS). Essas partículas foram utilizadas para o combate de células cancerosas.

Zu *et al* (2014) prepararam nanoesferas do fármaco resveratrol encapsulado com carboximetilquitosana e obtiveram diâmetro médio de 155,3 nm (DLS). Nesse estudo avaliaram a atividade antioxidante do medicamento.

Snima et al (2012) obtiveram NPs de carboximetilquitosana com metformina com tamanhos de aproximadamente 240,0 nm, essas NPs poliméricas foram utilizadas para o combate de câncer no pâncreas.

As nanoesferas poliméricas magnéticas apresentaram tamanhos superiores às nanoesferas poliméricas (Tabela 10), com diâmetros obtidos entre 331,9 nm a 482,5 nm, comprovando que a presença das NPsM altera o tamanho das nanoesferas. Todavia, esses tamanhos estão dentro do esperado para NPsM poliméricas, por exemplo, Huanga et al (2010) obtiveram NPsM revestidas por quitosana com tamanhos entre 236,2 e 417,0 nm (microscopia eletrônica de transmissão-MET), e 2981 a 3075 nm quando analisadas por DLS. Foi observado também que o aumento da quantidade de fármaco não mostrou diâmetros crescentes das partículas.

O IPd da maioria das amostras está dentro do indicado pela Malvern Instruments (2014), ela recomenda IPd entre 0,08 a 0,7, para uma melhor distribuição das partículas. Apenas a amostra 3, com 6% de fármaco, apresentou um IPd igual a 1, significando uma distribuição irregular de tamanhos, com possíveis partículas grandes e pequenas. Foram realizadas as medidas de potencial zeta (PZ), os valores podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de potencial zeta das nanoesferas poliméricas magnéticas e nanoesferas poliméricas.

Polímeros			
x	1%	3%	6%
% Acetoxi DMU	PZ	PZ	PZ
CMQT 1,5	19,4 ± 4,67	14,9 ± 3,22	17,6 ± 2,97
CMQT 1,5			
+	14,6 ± 2,85	12,5 ± 3,57	16,5 ± 4,47
CoFe₂O₄@AO-9/1000			
CMQT-BZ 3,5	10,5 ± 5,25	9,9 ± 5,28	26,2 ± 4,14
CMQT-BZ 3,5			
+	22,3 ± 3,49	22,6 ± 3,63	22,8 ± 4,49
CoFe₂O₄@AO-90/1000			

*1%, 3%, 6% da quantidade em massa do fármaco em relação a massa do polímero.

*Nanoesferas poliméricas (Polímero + fármaco): CMQT ou CMQT-BZ.

*Nanoesferas poliméricas magnéticas (Polímero + NPsM + fármaco): CMQT + CoFe₂O₄@AO-90/1000 e CMQT-BZ + CoFe₂O₄@AO-90/1000.

Através do PZ foi analisado a carga superficial das nanoesferas poliméricas magnéticas e das nanoesferas poliméricas. Foram obtidos valores positivos de PZ para todas as amostras indicando que as NPs de CoFe₂O₄ podem estar no interior das nanoesferas, pois as NPsM apresentaram valores de PZ negativos. Esses valores indicam uma certa estabilidade das dispersões analisadas, pois valores de PZ mais próximos de +30 e de -30 são considerados sistemas estáveis e com menos chance de aglomeração.

5.5. Validação do Método Analítico para o Acetoxi DMU

Foi realizado a validação do método analítico para o fármaco. O Ac.DMU não apresentou solubilidade em água, álcool etílico e na mistura água/álcool etílico, porém, foi solúvel em hexano, diclorometano, álcool metílico e na mistura água/álcool metílico. Assim sendo, para a escolha do solvente mais apropriado foi levando em conta a solubilização eficiente, menor custo e menor toxicidade quando comparado aos demais solventes testados. O solvente escolhido foi a mistura água/álcool metílico (50:50 v/v).

Com o objetivo de observar o comprimento de onda de maior absorção do Ac.DMU no solvente escolhido, medidas de absorbância de uma solução de Ac.DMU na concentração de 22 µg/mL foram realizadas no espectrofotômetro no intervalo de 200 a 800 nm. O comprimento de onda de máxima absorção em 315 nm foi escolhido para as análises quantitativas (Figura 39a).

Foi observado que os polímeros CMQT 1,5M e CMQT-BZ 3,5M (Figura 39b e 39c), utilizados no recobrimento do fármaco, não absorvem em 315 nm, portanto a absorção nesse comprimento de onda pode ser utilizada para as análises quantitativas do Ac.DMU.

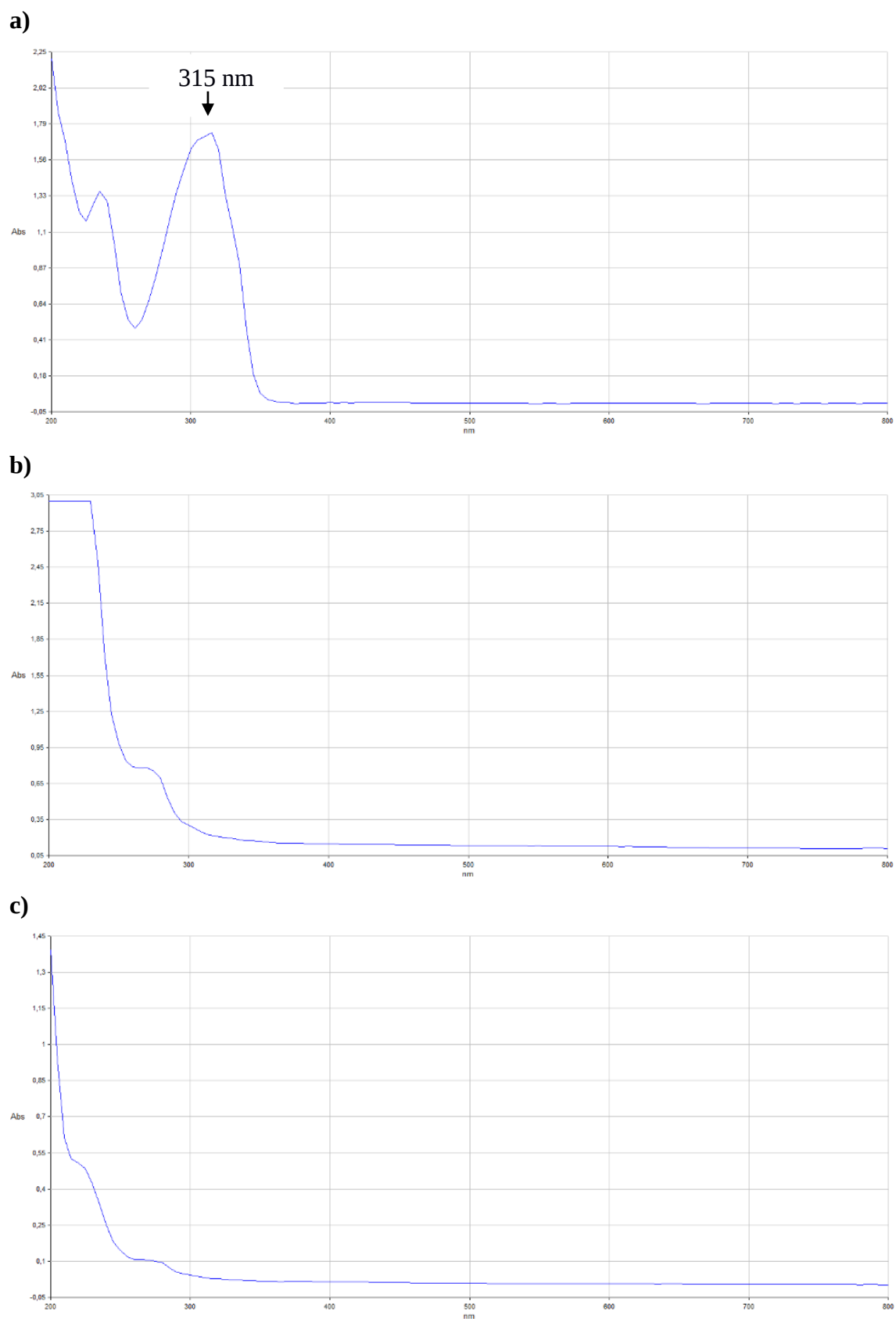


Figura 39: Espectro de comprimento de onda de maior absorção (a) Ac.DMU (b) CMQT 1,5M (c) CMQT-BZ 3,5M.

Inicialmente, foi avaliado a linearidade medindo-se as absorvâncias de seis soluções de Ac.DMU nas concentrações de 2, 6, 10, 14, 18, e 22 µg/mL. Na Tabela 12 encontram-se as absorvâncias obtidas para cada concentração analisada. A Figura 40 mostra as curvas de calibração do padrão de Ac.DMU e os gráficos de resíduos para os valores preditos. Também é possível observar a equação da reta de cada uma das curvas de calibração.

Tabela 12: Absorvâncias do Ac.DMU com concentrações variando de 2 a 22 µg/mL.

Concentração µg/mL	Absorvância Curva padrão 1	Absorvância Curva padrão 2	Absorvância Curva padrão 3
2	0,133	0,125	0,114
6	0,389	0,361	0,345
10	0,620	0,576	0,561
14	0,860	0,811	0,797
18	1,157	1,082	1,073
22	1,321	1,260	1,264

A média das 3 curvas de calibração padrão foram realizadas, bem como a média para os coeficientes de correlação da reta, resultando na equação $y = 0,00894 + 0,05887x$ (absorvância=0,00894 + 0,05887 [Acetoxi DMU] mg mL⁻¹), com um coeficiente de correlação de 0,997. O resultado é concordante com uma boa linearidade dos dados, pois o INMETRO (2003) sugere valores de coeficiente de correlação acima de 0,90 e a ANVISA (2003), valores iguais ou superiores a 0,997.

Os gráficos de resíduos presentes na Figura 40 apresentam um comportamento de distribuição ao redor de zero. Segundo reportado na literatura por Ribeiro et al (2008), os resíduos são interpretados com uma estimativa de erro, e eles devem ser normalmente distribuídos ao redor de zero.

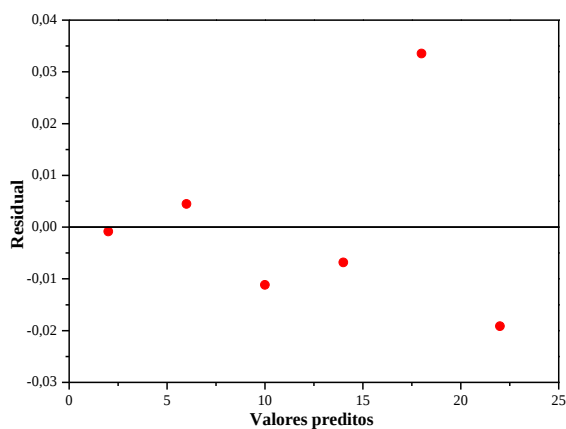
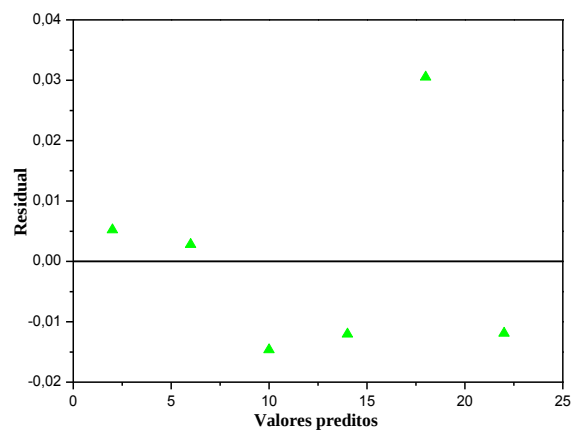
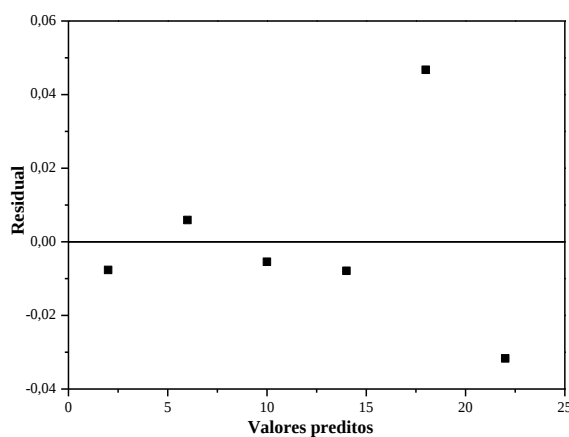
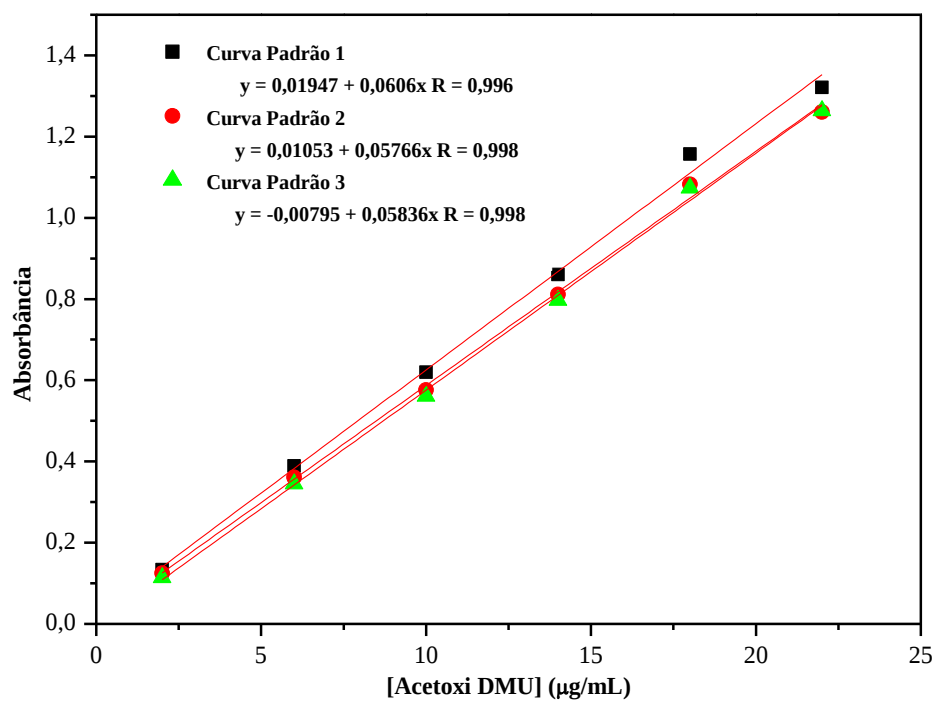


Figura 40: Curvas de calibração padrão do Ac.DMU e gráficos de resíduos para os valores preditos e equações da reta de cada uma das curvas de calibração.

Os valores do estudo de exatidão para o Ac.DMU estão sumarizados na Tabela 13, e demonstram percentuais de recuperação entre 96% a 109%, portanto de acordo com a resolução número 899 da ANVISA (2003). Essa resolução especifica que o teor recuperado do fármaco deve situar-se entre 80 % a 120%.

Tabela 13: Resultados obtidos no estudo da exatidão para o Acetoxi DMU

Concentração de Ac.DMU (µg/mL)	Amostra	Concentração de Ac.DMU encontrada (µg/mL) + Concentração média de Ac.DMU encontrada (µg/mL) ±DRP n=6	Taxa de recuperação e Taxa média de recuperação
2,0	1.1	2,2	110%
	1.2	2,2	110%
	1.3	2,0	100%
	2.1	2,2	110%
	2.2	2,2	110%
	2.3	2,2	110%
10,0	1.1	9,7	97%
	1.2	9,6	96%
	1.3	9,8	98%
	2.1	9,5	95%
	2.2	9,6	96%
	2.3	9,6	96%
22,0	1.1	22,0	100%
	1.2	22,1	110,5%
	1.3	22,0	100%
	2.1	22,1	110,5%
	2.2	22,1	110,5%
	2.3	22,1	110,5%

Obs: amostra 1: primeiro dia, amostra 2: segundo dia.

Utilizando as Equações 2 e 3 e os valores da inclinação da curva e desvio padrão do intercepto com o eixo y, foi possível calcular o LD e o LQ. Os valores obtidos foram, para o LD: 0,87 µg/mL e para o LQ: 2,9 µg/mL.

A precisão foi determinada através de triplicata em concentrações diferentes, 2,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 22,0 µg/mL, sendo analisada a precisão intermediária (inter-dia) e a repetibilidade (intra-dia). Para a determinação foi utilizado o cálculo do desvio padrão relativo (DRP), os resultados estão dispostos nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14: Níveis de precisão (repetitibilidade) para validação do método de determinação do Ac.DMU.

Concentração de Ac.DMU adicionada (µg/mL)	Manhã ±DRP %	Tarde ±DRP %	Repetitibilidade Intra-corrida n=6 ±DRP
2,0	1,01	0,685	0,85
10,0	0,234	0,183	0,21
22,0	0,102	0,067	0,085

Tabela 15: Níveis de precisão (intermediária) para validação do método de determinação do Ac.DMU.

Concentração de Acetoxi-DMU adicionada (µg/mL)	1º Dia ±DRP %	2º Dia ±DRP %	Precisão intermediária Inter-dia n=6 ±DRP
2,0	1,01	0,963	0,987
10,0	0,234	0,223	0,229
22,0	0,102	0,098	0,10

Os valores obtidos pelo estudo da precisão para reprodutibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-dia) mostram que o método apresenta boa reprodutibilidade, com valores de DRP% iguais ou abaixo de 1,01%. Esses valores estão concordantes com o predeterminado pela ANVISA (2003), a qual recomenda valores de DRP% de até 5%.

Sendo assim, pode-se afirmar que a técnica utilizada é adequada quanto a linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão e exatidão, na faixa de concentração entre 22 µg/mL e 2 µg/mL, para análise de quantificação do Ac.DMU.

5.6. Recuperação Percentual e Determinação da Eficiência de Encapsulação do Acetoxi DMU

A recuperação percentual do Ac.DMU na dispersão foi calculada através da Equação 4, e os valores estão na Tabela 16. A recuperação percentual do Ac.DMU

encontra-se entre 54,3% e 99,5%, indicando que o Ac.DMU permaneceu estável na dispersão durante o processo de produção das nanoesferas.

A EE (%) do Ac.DMU às nanoesferas, foi calculada através da Equação 5 e os valores estão sumarizados na Tabela 16.

Tabela 16: Valores de recuperação percentual e EE % do Ac.DMU.

[Ac.DMU]	Recuperação (%)				EE (%)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1%	54,3	76,4	89,4	95,6	78,7	64,3	42,8	33,6
3%	94,1	90,9	95,9	82,7	69,4	92,1	43,9	16,0
6%	94,3	97,7	99,5	96,0	51,5	96,1	31,8	57,7

*1%, 3%, 6% da quantidade em massa do fármaco em relação a massa do polímero.

*Polímeros (1: CMQT; 2: CMQT + CoFe₂O₄@AO-90/1000; 3: CMQT-BZ; 4: CMQT-BZ + CoFe₂O₄@AO-90/1000).

A EE (%) do Ac.DMU às nanoesferas variou de 16,0% a 96,1%. As nanoesferas preparadas com o polímero CMQT 1,5M apresentaram maior EE (%) quando comparadas àquelas com o CMQT-BZ 3,5M. A presença das NPsM na síntese da amostra 2 também elevaram o teor de encapsulação, justificado pelas fortes interações hidrofóbicas entre as NPsM e o fármaco.

O polímero CMQT mostrou melhor eficiência quando comparado com o CMQT-BZ. A amostra contendo o CMQT e 1% de fármaco apresentou um bom teor de encapsulação, 78,7%, e tamanho próximo a 133,1 nm. A amostra contendo CMQT, CoFe₂O₄@AO-90/1000 e 3% de fármaco apresentou EE de 92,1% e tamanho em torno de 331,9 nm. Essa mesma amostra com 6% de fármaco apresentou EE de 96,1% e tamanho próximo a 367,6 nm. Portanto, esses valores obtidos indicam amostras com potenciais aplicações.

A literatura relata a produção de nanoestruturas com elevados teores de encapsulação, Anitha et al (2011) produziram NPs poliméricas com eficiência de encapsulação de 87% para a curcumina revestida com o CMQT. Debrassi et al (2012) obtiveram uma EE entre 60,8 e 74,8% com a produção de nanopartículas de CMQT-BZ

com o fármaco indometacina na presença e ausência de NPsM. Buzanello et al (2014) validaram o método para a curcumina e calcularam o teor de encapsulação de nanopartículas de curcumina revestida com Poli (L-ácido láctico), PLLA, através da espectroscopia UV-Visível e obtiveram EE entre 67,0 e 98,4%. Assim sendo, com os resultados obtidos por DLS e com a EE obtida por UV-Vis, é possível afirmar que o derivado CMQT pode ser utilizado como polímero de revestimento em sistemas nanoestruturados, e que a combinação de NPsM de CoFe_2O_4 com o polímero CMQT e com o princípio ativo Ac.DMU apresentam eficientes resultados e podem ser empregados na produção de NPs para liberação do fármaco por via endovenosa. O CMQT-BZ também pode ser utilizado como polímero de revestimento, entretanto, apresentou um menor teor de encapsulação.

6. CONCLUSÕES

As NPsM de CoFe_2O_4 foram sintetizadas pelo método de coprecipitação química e foram obtidas com sucesso. A distribuição de tamanho aparentes das partículas obtidas por DLS apresentou-se dentro da faixa em que se encontra o diâmetro crítico da ferrita de cobalto (abaixo de 70 nm), entre 21,49 nm e 57,75 nm, exceto a ferrita de cobalto sem AO, que apresentou uma distribuição média aparente de 146,6 nm, esses tamanhos elevados possivelmente são causados pela aglomeração das partículas, formando clusters, devido a interações magnéticas dipolo-dipolo. Os resultados obtidos foram relacionados com a largura a meia altura estimada por DRX e os valores estão condizentes e seguem uma tendência, quanto maior o valor da largura a meia altura (picos mais largos) menor é o tamanho da partícula, e picos mais finos indicam partículas maiores. Através do DRX pode-se afirmar que as amostras apresentaram estrutura cúbica de espinélio parcialmente inverso e a presença de AO não interferiu na obtenção da CoFe_2O_4 . A análise de PZ mostrou carga superficial negativa para as amostras de NPsM com AO, também indicou valor de PZ mais elevado para a dispersão contendo a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$, caracterizando a amostra com melhor estabilidade. Os espectros de FTIR com as curvas de TG/DTA e DSC constatarem a surfactação com AO de duas amostras, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/600}$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$, e foi observado que a temperatura de aquecimento da mistura de cobalto e de ferro influenciou significativamente na rota sintética, ocasionando a surfactação das amostras a temperatura de 90 °C e a não surfactação das amostras a 80 °C. O surfactante AO proporcionou partículas hidrofóbicas e limitou a aglomeração das partículas. As propriedades magnéticas se mostraram promissoras para bioaplicações apresentando valores de coercividade e magnetização remanente baixos, e as amostras surfactadas com AO apresentaram maior magnetização de saturação, as curvas ZFC-FC mostraram as temperaturas de bloqueio características de partículas de CoFe_2O_4 e a amostra $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ foi a que mais se aproximou de propriedades superparamagnéticas.

A quitosana foi utilizado como polímero de partida e os derivados sintetizados, CMQT e CMQT-BZ, foram obtidos com êxito como demonstrado pelos espectros de FTIR, DSC/TG/DTA e RMN ^1H , onde pôde-se observar a inserção dos grupos carboximetil e do anel aromático nas amostras, também através do RMN ^1H foi calculado o GS para cada amostra de CMQT-BZ e os resultados obtidos situaram-se

entre 40 e 66%. As análises de titulações potenciométricas e condutimétricas, mostraram o GA para quitosana de 16,3% e o GD de 83,7% e para a amostra CMQT 1,5M o GA foi de 80,1% e o GD 44,1%, resultados condizentes com o reportado na literatura.

As nanoesferas poliméricas magnéticas e as nanoesferas poliméricas contendo o fármaco, foram obtidas através do método de emulsão difusão do solvente. Os resultados obtidos por DLS apontam a diferença de tamanho aparente quando há a presença de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ e quando a síntese ocorre na sua ausência. Para as nanoesferas poliméricas magnéticas o tamanho médio aparente situou-se entre 332 e 482 nm e para as nanoesferas poliméricas entre 134 e 320 nm. Através das medidas de PZ foi observado que possivelmente as NPsM estão no interior das nanoesferas, e os coloides apresentam certa estabilidade, no entanto, são necessárias outras técnicas de caracterização para a confirmação.

A eficiência de encapsulação para as amostras obtidas situou-se entre 16 e 96,1%, mostrando que o carboximetilquitosana na presença da $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO-90/1000}$ apresentou-se como melhor polímero para encapsulação, EE entre 64,3 e 96,1%.

7. ESTUDOS COMPLEMENTARES

- Caracterizações das NPs poliméricas e NPs poliméricas magnéticas;
- Publicações de artigos.

8. REFERÊNCIAS

ABREU, F. R.; CAMPANA, S. P. F. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 214–221, 2009.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL–ABDI. Brasília–Brasil, [citado em 2015, Janeiro 18] Estudos setoriais de inovação: transformados plásticos. Disponível em:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA/BRASIL. Resolução RE nº899 de 29/5/2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1.

AJROUDI, L.; MLIKI, N.; BESSAIS, L.; MADIGOU, V.; VILLAIN, S.; LEROUX, C. Magnetic, electric and thermal properties of cobalt ferrite nanoparticles. **Materials Research Bulletin**, v. 59, p. 49–58, 2014.

ALONSO, A.; RIENTE, P.; YUS, M. Synthesis of resveratrol, DMU-212 and analogues through a novel Wittig-type olefination promoted by nickel nanoparticles. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 3070–3073, 2009.

AMIRI, S.; SHOKROLLAHI, H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1–8, 2013.

ANITHA, A.; MAYA, S.; DEEPA, N.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Curcumin-loaded N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for cancer drug delivery. **Journal of Biomaterials Science**, v. 23, p. 1381-1400, 2012.

ANITHA, A.; MAYA, S.; DEEPA, N.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R.; Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 452–461, 2011.

AYYAPPAN, S.; PANNEERSELVAM, G.; ANTONY, M. P.; PHILIP, J. High temperature stability of surfactant capped CoFe₂O₄ nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 130, p. 1300– 1306, 2011.

BAE, Y.; BAE, H.; PARK, K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 198–205, 2011.

BALDI, G.; BONACCHI, D.; INNOCENTI, C.; LORENZI, G.; SANGREGORIO, C. Cobalt ferrite nanoparticles: The control of the particle size and surface state and their effects on magnetic properties. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 10–16, 2007.

BAUR, J. A.; PEARSON, K. J.; PRICE, N. L.; JAMIESON, H. A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V. V.; ALLARD, J. S.; LOPEZ, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P. J.; POOSALA, S.; BECKER, K. G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K. W.; SPENCER, R. G.; LAKATTA, E. G.; LECOUEUR, D.; SHAW,

R. J.; NAVAS, P.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D. K.; DE CABO, R.; SINCLAIR, D. A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, p. 337-42, 2006.

BIDGOLI, H.; ZAMANI, A.; TAHERZADEH, M. J. Effect of carboxymethylation conditions on water binding capacity of chitosan-based superabsorbents. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 2683-2689, 2010.

BRICENO, S.; ESCAMILLA, W.; SILVA, P.; DELGADO, G. E.; PLAZA, E.; PALACIOS, J.; CANIZALES, E. Effects of synthesis is variable on the magnetic properties of CoFe₂O₄ nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, p. 2926-2931, 2012.

BUSHAN, B. **Springer Handbook of Nanotechnology**, 2^a ed. Wurzburg: Springer-Verlag, 2007.

BUZANELLO, R. A. S.; FERRO, A. C.; BONA, E.; FILHO, L. C.; ARAÚJO D, P. H. H.; LEIMANN, F. V. GONÇALVES, O. H. Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly (L-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 172, p. 99-104, 2014.

CALLISTER, W.D. **Materials science na engineering: na Introduction**. 7 Ed. New York: John Wiley. 2010. 832p.

CAMARGO, C. A. "Atividade Anticâncer de Quercetina, Narigina, Morina e Acetoxi DMU no Tratamento Terapêutico de Ratos Inoculados com Carcinossarcoma de Walker 256". 2011, 135 f. Dissertação de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas – São Paulo. 2011.

CASETTARI, L.; VLLASALIU, D.; CASTAGNINO, E.; STOLNIK, S.; HOWDLE, S.; ILLUM, L.; PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 659- 685, 2012.

CHAVANPATIL, M. D.; JAIN, P.; CHAUDHARI, S.; SHEAR, R.; VAVIA, P. R. Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastroretentive drug delivery system for ofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, p. 86-92, 2006.

CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 333-340, 2003.

CHEN, X. G.; PARK, H. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosan related to the preparation condition. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 355-359, 2003.

CHIA, C. H.; ZAKARIA, S.; YUSOFF, M.; GOH, S. C.; HAW, C. Y.; AHMADI, S.; HUANG, N. M.; LIM, H. N. Size and crystallinity-dependent magnetic properties of CoFe₂O₄ nanocrystals. **Ceramics International**, v. 36, p. 605-609, 2010.

CHINNASAMY, C.N; JEYADEVAN, B; SHINODA, K. Unusually high coercivity and critical single-domain size of nearly monodispersed CoFe_2O_4 nanoparticles. **Applied Physics Letters**, v. 83. p. 2862. 2003

CULLITY, B.D. e GRAHAM, C.D. **Introduction to Magnetic Materials**. 2nd edition. Wiley, New Jersey, 2009, 550p.

DASH, A.; CUDWORTH II, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems, **Journal Pharmacol Toxicol Methods**, v. 40, p. 1–12, 1998.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan: a versatile semisynthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DEBRASSI, A.; BURGER, C.; RODRIGUES, C. A.; NEDELKO, N.; LAWSKA-WANIEWSKA, A.; DŁUZEWSKI, P.; SOBCZAK, K.; GRENECHE, J. M. Synthesis, characterization and in vitro drug release of magnetic N-benzyl-O-carboxymethylchitosan nanoparticles loaded with indomethacin. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 3078–3085, 2011.

DEBRASSI, A.; CORREA, A. F.; BACCARIN, T.; NEDELKO, N.; S' LAWSKA-WANIEWSKA, A.; SOBCZAK, K.; ŁUZ' EWSKI, P.; GRENECHE, J. M.; RODRIGUES, C. A.; Removal of cationic dyes from aqueous solutions using N-benzyl-O-carboxymethylchitosan magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 284– 293, 2012.

DEY, A.; PURKAIT, M. K.; Effect of fatty acid chain length and concentration on the structural properties of the coated CoFe_2O_4 nanoparticles. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2014.

EMÍLIA, M. J.; ALFARAS, I.; PLANAS, J. M. Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. **Pharmacological Research**, v. 65, p. 584– 591, 2012.

FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, p. 1–37, 2010.

FARIA, R.N.; LIMA, L.F.C.P. **Introdução ao magnetismo dos materiais**. São Paulo, 1995. 192p.

FRANCO, A.; SILVA, F. C. High temperature magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. **Applied Physics Letters**, v. 96, p. 172505, 2010.

FREDENBERGA, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 34–52, 2011.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLAROS, G.; MICALI, N.; FURNERI, P. M.; Pefloxacin mesilate- and of loxacin-loaded polyethylcyanoacrylate

nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 895–902, 1995.

GAUDISSON, T.; ARTUS, M.; ACEVEDO, U.; HERBST, F.; NOWAK, S.; VALENZUELA, R.; AMMAR, S. On the micro structural and magnetic properties of fine-grained CoFe_2O_4 ceramics produced by combining polyol process and spark plasma sintering. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 370, p. 87–95, 2014.

GE, H. C.; LUO, D. K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1351–1356, 2005.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, 2011.

GUO, Z.; CHEN, R.; XING, R.; LIU, S.; YU, H.; WANG, P.; LIA, C.; LIA, P. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 351–354, 2006.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticle technology for drug delivery**. Taylor & Francis Group, New York. v.159, p.1-18, 2006.

GYERGYEKA, S.; DROFENIKA, M.; MAKOVECA, D. Oleic-acid-coated CoFe_2O_4 nanoparticles synthesized by co-precipitation and hydrothermal synthesis. **Materials Chemistry and Physics**, v. 133, p. 515–522, 2012.

HABIBI, M. H.; PARHIZKAR, H. J. FTIR and UV–Vis diffuse reflectance spectroscopy studies of the wet chemical (WC) route synthesized nano-structure CoFe_2O_4 from CoCl_2 and FeCl_3 . **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 102–106, 2014.

HANS, M.L.; LOWMAN, A. M. biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319–327, 2002.

HARRIS, L.A. Polymer stabilized magnetite nanoparticles and poly (propylene oxide) modified styrene-dimethacrylate networks. 2002. 161 f. Tese (Doctor of Philosophy in Chemistry), Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia.

HOUSHIAR, M.; ZEBHI, F.; RAZI, Z. J.; ALIDOUST, A.; ASKARI, Z. Synthesis of cobalt ferrite (CoFe_2O_4) nanoparticles using combustion, coprecipitation, and precipitation methods: A comparison study of size, structural, and magnetic properties. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 371, p. 43–48, 2014.

HUANGA, C.; TANGA, Z.; ZHOUB, Y.; ZHOUC, X.; JINC, Y.; LI, D.; YANGA, Y.; ZHOU, S. Magnetic micelles as a potential platform for dual targeted drug delivery in cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 429, p. 113–122, 2012.

HUANGA, H. Y.; SHIEHB, Y. T.; SHIHA, C. M.; TWUA, Y. K. Magnetic chitosan/iron (II, III) oxide nanoparticles prepared by spray-drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 906–910, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL-INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION-ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2R1). International Conference on Harmonisation, Geneva, p. 13, 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. ANALYTICAL-IUPAC, Applied, Clinical, Inorganic, And Physical Chemistry Divisions Interdivisional Working Party For Harmonization Of Quality Assurance Schemes For Analytical Laboratories Harmonized Guidelines For Singlelaboratory Validation Of Methods Of Analysis, London, p. 21, 2002.

JANG, D. S.; KANG, B. S.; RYU, S. Y.; CHANG, I. M.; MIN, K. R.; KIM, Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. **Biochemical pharmacology**, v. 57, p. 705-12, 1999.

JEONG, U.; TENG, X. W.; WANG, Y.; YANG, H.; XIA, Y. N. Superparamagnetic colloids: Controlled synthesis and niche applications. **Advanced Materials**, v. 19, n. 33–60, 2007.

JIAO, T. F.; ZHOU, J.; ZHOU, J.; GAO, L.; XING, Y.; LI, X. Synthesis and Characterization of Chitosan-based Schiff Base Compounds with Aromatic Substituent. **Groups Iranian Polymer Journal**, v. 20, p. 123-136, 2011.

JIN, Y. H.; HUA, H. Y.; QIAOA, M. X.; ZHUA, J.; QIA, J. W.; HUA, C. J.; ZHANGB, Q.; CHENA, D. W. pH-sensitive chitosan-derived nanoparticles as doxorubicin carriers for effective anti-tumor activity: preparation and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 184– 191, 2012.

JUN, Y.W.; SEO, J.W.; CHEON, J. Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences. **Accounts Of Chemical Research**, v. 41, p. 179-189, 2008.

KARIMI, Z.; KARIMI, L.; SHOKROLLAHI, H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 2465–2475, 2013.

KARTHIKEYAN, S.; RAJENDRA, N. P.; GANAMANI, A.; BALAMURUGAN, E. Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 64–73, 2013.

KIEVIT, F. M.; ZHANG, M. Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, p. 853–862, 2011.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; ARICHI, S. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 834, p. 275-8, 1985.

KITTUR, F. S.; HARISH, P. K. V.; UDAYA, S. K.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 185–193, 2002.

KOZARSKI, M. S.; KLAUS, A. S.; NIKŠIĆ, M. P.; GRIENSVEN, L. J. L. V.; VRVIĆ, M. M.; JAKOVLJEVIĆ, D. M. Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidative activity. **Hemijška industrija**, v. 68, p. 305–320, 2014.

KUCHIBHATLA, S.V.N.T.; KARAKOTI, A.S; SEAL, S. Colloidal Stability by Surface Modification. **Journal of The Minerals, Metals & Materials Society**, v. 57, p. 52-56, 2000.

KUMAR, L.; KUMAR, P.; NARAYAN, A.; KAR, M. Rietveld analysis of XRD patterns of different sizes of nanocrystalline cobalt ferrite. **International Nano Letters**, v. 3, p. 8, 2013.

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J.; Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6017–6084, 2004.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. **Polymers**, v. 3, p. 1875-1901, 2011.

KURITA, K.; KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, v. 8, 203-206, 2006.

LAI, P.; DAEAR, W.; LÖBENBERG, R.; PRENNER, E. J. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 154–163, 2014.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, 2009.

LIU, G.; GAN, J.; CHEN, A.; LIU, Q.; ZHAO, X. Synthesis and characterization of an amphiphilic chitosan bearing octyl and methoxy polyethylene glycol groups. **Natural Science**, v. 2, p. 707-712, 2010.

LIU, X. M.; FU, S. Y.; XIAO, H. M.; HUANG, C. J. Synthesis of nanocrystalline spinel CoFe₂O₄ via a polymer-pyrolysis route. **Physica B**, v. 370, p. 14–21, 2005.

LONG, Y.; RAN, X.; ZHANG, L.; GUO, Q.; YANG, T.; GAO, J.; HUMIN C, CHENG, T.; SHI, C.; SU, Y. A method for the preparation of silver nanoparticles using commercially available carboxymethyl chitosan and sunlight. **Materials Letters**, v. 112, p. 01–104, 2013.

LOPEZ, J.; GONZALEZ, L. F. B.; PRADO, J.; CAICEDO, J. C.; ZAMBRANO, G.; GOMEZ, M. E.; ESTEVE, J.; PRIETO, P. Study of magnetic and structural properties of ferrofluids based on cobalt–zinc ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, p. 394–402, 2012.

LORENZO, C. A.; FERNANDEZ, B. B.; PUGA, A. M.; CANCHEIRO, A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, v. 1148–1171, 2013

LU, Y.; LU, X.; MAYERS, B.T.; HERRICKS, T.; XIA, Y. Synthesis and characterization of magnetic Co nanoparticles: A comparison study of three different capping surfactants. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 181, p. 1530-1538, 2008.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; BRUNETTI, I. L.; DA FONSECA, L. M.; KHALIL, N. M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 257-267, 2009.

MATHEW, D.S.; JUANG, R.S. An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions. **Chemical Engineering Journal**, v. 129, p. 51–65, 2007.

MATOS, M.; GUTIÉRREZ, G.; COCA, J.; PAZOS, C. Preparation of water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) double emulsions containing trans-resveratrol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 69– 79, 2014.

MILLER, F. A.; WILKINS, C. H. Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions. **Department of Research in Chemical Physics, Mellon Institute, Pittsburgh**, v. 24, n. 8, 1254-1294, 1952.

MIRANDA, M. E. S.; MARCOLLA, C.; RODRIGUES, C. A.; WILHELM, H. M.; SIERAKOWSKI, M. R.; BRESOLIN, T. M. B. Chitosan and N-carboxymethylchitosan: I. The role of N-carboxymethylation of chitosan in the thermal stability and dynamic mechanical properties of its films. **Polymer International**, v. 55, p. 961–969, 2006.

MOHAMEDA, N. A.; SABAA, M. W.; EL-GHANDOUR, A. H.; ABDEL-AZIZ, M. M.; ABDEL-GAWAD, O, F. Quaternized N-substituted carboxymethyl chitosan derivatives as antimicrobial agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 156– 164, 2013.

MORAIS, P. C.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, L. P; AZEVEDO, R. B.; SILVA, A. M. L.; LIMA, E. C. D. Synthesis and characterization of size-controlled cobalt-ferrite-based ionic ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, p. 37-40, 2001.

MORIYAMA, A. L.; MADIGOU, V.; SOUZA, C. P.; LEROUX, C. Controlled Synthesis Of CoFe₂O₄ Nano-Octahedra. **Powder Technology**, v. 256, p. 482–489, 2014.

MORO, A. V. Arilações de Heck com Sais de Diazônio: Estudos Metodológicos e Aplicações nas Sínteses de Ligantes Quirais, Produtos Naturais e Análogos. 2010, 311 f. Tese de doutorado, Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas – São Paulo.

MORO, A. V.; CARDOSO, F. S. P.; CORREIA, C. R. D. Heck arylation of styrenes with arenediazonium salts: short, efficient, and stereoselective synthesis of resveratrol, DMU-212, and analogues. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 5668–5671, 2008.

MULLER, V.; PIAI, J. F.; FAJARDO, A. R.; FAVARO, S. L.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Preparation and Characterization of Zein and Zein-Chitosan Microspheres with Great Prospective of Application in Controlled Drug Release. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 6, 2011.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSEINI, A.; CHEN, P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 166, p. 182–194, 2013.

NAHAR, M.; MISHRA, D.; DUBEY, V.; JAIN, N. K. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 4, p. 252–261, 2008.

NATIONAL CANCER INSTITUTE-NCI, USA [citado em 2015 Janeiro, 10]. Disponível em:

OH, M.; LEE, J. H.; BAE, S. Y.; SEOK, J. H.; KIM, S.; CHUNG, Y. B.; HAN, K. R.; KIM, K. H.; CHUNG, M. S. Protective effects of red wine and resveratrol for foodborne virus surrogates. **Food Control**, v. 47, p. 502–509, 2015.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. 167–181, 2003.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 147–166, 2012.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ, L. G.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ, C. M. Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 272–280, 2013.

PEREZ, C. C.; PENA, J. M.; CORREIA, C. R. D. Improved synthesis of bioactive stilbene derivatives applying design of experiments to the Heck–Matsuda reaction. **New Journal Chemical**, v. 38, p. 3933, 2014.

PILLAI, C.K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641–678, 2009.

PIOTROWSKA, H.; MYSZKOWSKI, K.; ABRASZEK, J.; KWIATKOWSKA, E. B.; AMAROWICZ, R.; MURIAS, M.; WIERZCHOWSKI, M.; JODYNIS, J. L. DMU-212 inhibits tumor growth in xenograft model of human ovarian cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, p. 397–400, 2014.

RABEA, E.; BADAWY, M.; ROGGE, T. M.; STEVENS, C. V.; HOFTE, M.; STEURBAUT, W.; SMAGGHE, G. Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. **Pest Management Science**, v. 61, p. 951–960, 2005.

RAJAEIYAN, A.; BAGHERI-MOHAGHEGHI, M. M. Comparison of sol-gel and co-precipitation methods on the structural properties and phase transformation of c and Al_2O_3 nanoparticle. **Journal of Advanced Manufacturing**, v. 1, p. 176–182, 2013.

RAJPUT, J.; K.; KAUR, G. CoFe_2O_4 nanoparticles: Na efficient heterogeneous magnetically Separable catalyst for “click” synthesis of arylidene barbituric acid derivatives at room temperature. **Chinese Journal Catalysis**, v. 34, p. 1697-1704, 2013.

RANA, S.; PHILIP, J.; RAJ, B. Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry. **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, p. 264–269, 2010.

RAOA, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887–913, 2011.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8–21, 2006.

RIBEIRO, F. A.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603–632, 2006.

ROONASI, P.; HOLMGREN, A. A Fourier transform infrared (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) study of oleate adsorbed on magnetite nano-particle surface. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 5891–5895, 2009.

SALE, S.; TUNSTALL, R. G.; RUPARELIA, K. C.; POTTER, G. A.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU- 12) on adenoma development in the Apc(Min⁺) mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells. **International journal of cancer**, v. 115, p. 194-201, 2005

SALE, S.; VERSCHOYLE, R. D.; BOOCOOCK, D.; JONES, D. J.; WILSHER, N.; RUPARELIA, K. C.; POTTER, G. A.; FARMER, P. B.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. **British journal of cancer**, v. 90, p. 736-44, 2004.

SCHERER, F.; ANTON, M.; SCHILLINGER, U. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. **Gene Therapy**, v.9, n. 2, p. 102–109, 2002.

SHAW, R. Dynamic Light Scattering. Malvern Instrument, 2014.

SINGH, A.V. Biopolymers in Drug Delivery: A Review. **Pharmacology online**, v. 1, p. 666–674, 2011.

SINKO, K.; MANEK, E.; MEISZTERICS, A.; HAVANCSAK, K.; VAINIO, U.; PETERLIK, H. Liquid-phase syntheses of cobalt ferrite nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 894, 2012.

SINNECKER, J.P. Materiais magnéticos doces e materiais ferromagnéticos amorfos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, p. 396-405, 2000.

SNIMAA, K. S.; JAYAKUMAR, R.; UNNIKRISHNANB, A. G.; NAIR, S. V.; LAKSHMANANA, V. K. O-Carboxymethyl chitosan nanoparticles for metformin delivery to pancreatic cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p.1003–1007, 2012.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. **Polímeros**, v. 22, p. 101-106, 2012.

SUN, S. Recent Advances in Chemical Synthesis, Self-Assembly, and Applications of FePt Nanoparticles. **Advanced Materials**, v.18, p. 393-403, 2006.

SZOTEK, Z.; TEMMERMAN, W. M.; KÖDDERITZSCH, D.; SVANE, A.; PETIT, L.; WINTER, H. Electronic structures of normal and inverse spinel ferrites from first principles. **Condensed Matter, Materials Science**, v.74, p. 1-11, 2006.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. **Nanoparticulate Drug Delivery Systems**, informa healthcare, New York, London, 2007. 382 p.

THOMAS, R.; PARK, I. K.; JEONG, Y. Y. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 15910-15930, 2013.

THOTE, A. J.; CHAPPELL, J. T.; JR.; GUPTA, R. B.; KUMAR, R. Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, p. 43–57, 2005.

TORCHILIN, V.P. (editor), HAFELI, O.; CHASTELLAIN, M. Nanoparticulates as drug carriers. **Imperial College Press**, Londres. cap.18, p. 397-411, 2006.

UNSOY, G.; KHODADUST, R.; YALCIN, S.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 243–250, 2014.

UPADHYAYA, L.; SINGHB, J.; AGARWALC, V.; TEWARI, R. P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 452– 466, 2013.

VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M. B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 1–11, 2005.

WANG, R. H.; ZHENG, Y.; KIM, H. S.; XU, X.; CAO, L.; LUHASSEN, T.; LEE, M. H.; XIAO, C.; VASSILOPOULOS, A.; CHEN, W.; GARDNER, K.; MAN, Y. G.; HUNG, M. C.; FINKEL, T.; DENG, C. X. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. **Molecular cell**, v. 32, p. 11-20, 2008.

WANG, X.; LU, G.; GUO, Y.; WANG, Y.; GUO, Y. Preparation of high thermal-stabile alumina by reverse microemulsion method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 90, p. 225–229, 2005.

WANG, Z.; HUANG, Y.; ZOU, J.; CAO, K.; XU, Y.; WU, J. M. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. **International journal of molecular medicine**, v. 9, p. 77-9, 2002.

WEISER, J. R.; SALTZMAN, W. M. Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 664–673, 2014.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 298–327, 2008.

XIAOA, S.H.; LUOB, K.; ZHANGA, L. The structural and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles formed in situ in silica matrix. **Materials Chemistry and Physics**, v. 123, p. 385–389, 2010.

YANG, K.; PENG, H.; WEN, Y.; LI, L. Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 256, p. 3093–3097, 2010.

YUAN, H. L.; WANG, Y. Q.; SHAO, M. Z.; LIU, L. S.; CHEN, X. L.; LOU, S. Y.; YUAN, R. J.; HAO, HAO, Y. M.; L, N. LOW-temperature preparation of superparamagnetic CoFe₂O₄ microspheres with high saturation magnetization. **Nano Express**, v. 5, p. 1817-1821, 2010.

YU, F.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHU, G. Role of oleic acid ionic_molecular complexes in the flotation of spodumene. **Minerals Engineering**, v. 71, p. 7–12, 2015.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, 2007.

ZHANG, L.; HE, R.; GU, H. C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 2611–2617, 2006.

ZHANG, Y.; YANG, Z.; YIN, D.; LIU, Y.; FEI, C. L.; XIONG, R.; SHI, J.; YAN, G.L. Composition and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles prepared by the co-precipitation method. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, p. 3470–3475, 2010.

ZHAO, D.; WU, X.; GUAN, H.; HAN, E. Study on supercritical hydrothermal synthesis of CoFe₂O₄ nanoparticles. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 42, p. 226–233, 2007.

ZI, Z.; SUN, Y.; ZHU, X.; YANG, Z.; DAI, J.; SONG, W. Synthesis and magnetic properties of CoFe₂O₄ ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, p. 1251–1255, 2009.

ZU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, W.; ZHAO, X.; HAN, X.; WANG, K.; GE, Y. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of resveratrol-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Drug Delivery**, v. 11, p. 1-11, 2014.

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice 1

Tabela 17: Atribuição das frequências vibracionais ou bandas em cm^{-1} dos vários tipos de ligações químicas da CoFe_2O_4 sem AO e com AO, obtidas por FTIR.

Ligação X Amostra	AO	CoFe_2O_4	$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ -80/600	$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ -90/600	$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ -80/1000	$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ -90/1000
$\nu\text{O-H}$		3381	3357	3362	3363	3346
$\nu\text{CH(C=C)}$	3006					
$\nu_{as}\text{CH}_2$	2922			2918		2917
$\nu_s\text{CH}_2$	2853			2852		2847
NO_3		2436	2436		2428	2439
δCO_2		2358	2358	2350	2354	2353
NO_3^-		1782		1786	1790	1789
$\nu\text{C=O}$	1708			1708		1707
$\delta\text{O-H-O}$		1632	1625	1621	1625	1620
$\nu\text{C-O}$	1463					
$\nu_s\text{COO}$	1410			1407		
NO_3		1355	1349		1350	1361
νCOOH	1310			1296		
Fe-Co		963		972		979
$\delta\text{C=O}$	960			919		927
NO_3^-		828	831		831	835
$\nu\text{CH=CH}$	722			723		723
$\nu\text{Ferrita (M-O)}$ tetraédrico		610		619		618

9.2. Apêndice 2

Tabela 18: Atribuição das frequências vibracionais ou bandas em cm^{-1} dos vários tipos de ligações químicas da quitosana e da quitosana modificada, obtidas por FTIR.

Amostras X Ligações	ν O-H ou ν N-H	δ C-H e α sC-H	CO ₂	C=O Amida I	C-O-	NH ₂	C-O-	CH ₂	CH ₃	C-N Amida III	beta glicosí dicas	-C-O	C-O-C	beta glicosí dicas
Quitosana	3310	2890		1658		1586		1434	1383	1311	1151		1021	870
Carboximetilquitosana 1,0M	3350				1600		1412			1311		1080		
Carboximetilquitosana 1,5M	3338	2875	2368	1658	1600		1413			1311	1165	1065		876
Carboximetilquitosana 2,5M	3368	2933			1603		1412			1325		1065		876
Carboximetilquitosana 5,0M	3338	2904	2368		1600		1412			1310		1050		
Carboximetilquitosana-bz 3,5M	3342	3058	2339	1661							1130			804